RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère du Commerce

Direction Générale du Contrôle Economique et de la Répression des Fraudes

Direction des Laboratoires d'Essais et d'Analyses de la Qualité

Sous-Direction des Procédures et Des Méthodes Officielles D'analyses

MÉTHODES OFFICIELLES D'ANALYSES

Physico-Chimiques et Microbiologiques

Janvier 2016

MÉTHODES OFFICIELLES D'ANALYSES

LAITS ET PRODUITS DÉRIVÉS

VIANDES ET PRODUITS CARNÉS

CORPS GRAS D'ORIGINE ANIMALES ET VÉGÉTALES

CÉRÉALES ET PRODUITS DÉRIVÉS

EAUX MINÉRALES ET EAUX DE SOURCES

AUTRES PRODUITS

MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS: MÉTHODES HORIZONTALES

PRODUITS NON ALIMENTAIRES

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DU COMMERCE

DIRECTION GÉNÉRALE DU CONTRÔLE ÉCONOMIQUE ET DE LA RÉPRESSION DES FRAUDES

Direction des Laboratoires d'Essais et d'Analyses de la Qualité

MÉTHODES OFFICIELLES D'ANALYSES MICROBIOLOGIQUES ET PHYSICHO-CHIMIQUES RELATIVES AUX LAITS ETPRODUITS DÉRIVÉS

Sommaire

Méthodes microbiologiques	
1. Arrêté du 27 mars 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrement des germes totaux à 30 °C pour les poudres de lait et de lactosérum. (JO n° 32 - 2004)	**01**
2. Arrêté du 27 mars 2004 rendant obligatoire une méthode de contrôle microbiologique pour le lait stérilisé. (JO n° 32 - 2004)	**04**
3. Arrêté du 27 mars 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrement des organismes microbiens pour le lait fermenté. (JO n° 32 - 2004)	**05**
4. Arrêté du 24 mai 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrement des coliformes dans les laits fermentés. (JO n° 43 - 2004)	**07**
5. Arrêté du 24 mai 2004 rendant obligatoire une méthode de recherche des staphylocoques à coagulase positive pour le lait en poudre. (JO n° 43 - 2004)	**09**
6. Arrêté du 24 mai 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrement des micro-organismes caractéristiques par une technique de comtage des colonies à 37 °C dans le yaourt. (JO n° 43 - 2004)	**11**
7. Arrêté du 11 septembre 2004 rendant obligatoire une méthode de préparation des échantillons pour essai et dilutions en vue de l'examen microbiologique. (JO n° 70 - 2004)	**16**
8. Arrêté du 11 sempembre 2004 rendant obligatoire une méthode de contrôle microbiologique pour le lait pasteurisé. (JO n° 70 - 2004)	**20**
9. Arrêté du 11 septembre 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrement des coliformes pour les crèmes glacées et les glaces au lait. (JO n° 70 - 2004)	**24**
10. Arrêté du 23 janvier 2005 rendant obligatoire une méthode de recherche des salmonella dans le lait et les produits laitiers. (JO n° 42 - 2005)	**28**
11. Arrêté du 23 janvier 2005 rendant obligatoire une méthode d'analyse microbiologique du beurre. (JO n° 42 - 2005)	**39**
12. Arrêté du 23 janvier 2005 rendant obligatoire une méthode de prélèvement d'échantillons et d'analyse bactériologiques des glaces et crèmes glacées. (JO n° 42 - 2005)	**43**
13. Arrêté du 25 septembre 2005 rendant obligatoire une méthode de recherche de *Listeria monocytogènes* dans le lait et les produits laitiers. (JO n° 03 - 2006)	**49**

Méthodes physico-chimiques	
14. Arrêté du 16 août 2012 rendant obligatoire une méthode de détermination de la teneur en matière sèche dans le lait, la crème et le lait concentré non sucré. (JO n° 54 - 2013)	**58**
15. Arrêté du 8 décembre 2013 rendant obligatoire une méthode de détermination de la teneur en matière sèche des fromages et des fromages fondus. (JO n° 25 - 2014)	**61**
16. Arrêté du 27 août 2013 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en azote protéique dans le lait. (JO n° 38 - 2014)	**64**
17. Arrêté du 17 décembre 2013 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en matière grasse dans le fromage. (JO n° 67 - 2014)	**67**
18. Arrêté du 17 décembre 2013 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en matière grasse dans le lait. (JO n° 74 - 2014)	**71**
19. Arrêté du 17 décembre 2013 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en azote dans le lait. (JO n° 65 - 2014)	**80**
20. Arrêté du 18 octobre 2015 rendant obligatoire la méthode de détermination péparation de l'échantillon pour essai en vue de l'analyse physique et chimique du lait. (JO n° 58 - 2015)	**87**
21. Arrêté du 18 octobre 2015 rendant obligatoire la méthode de détermination de l'acidité titrable dans le lait sec. (JO n° 58 - 2015)	**89**

ARRETES, DECISIONS ET AVIS

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 5 Safar 1425 correspondant au 27 mars 2004 rendant obligatoire la méthode de dénombrement des germes totaux à 30 °C pour les poudres de lait et de lactosérum.

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 03-215 du 7 Rabie El Aouel 1424 correspondant au 9 mai 2003, modifié, portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n ° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n ° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 29 Safar 1414 correspondant au 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété par l'arrêté interministériel du 25 Ramadhan 1418 correspondant au 24 janvier 1998 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n ° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de dénombrement des germes totaux à 30 ° C dans les poudres de lait et de lactosérum.

Art. 2. — Pour le dénombrement des germes totaux à 30° C dans les poudres de lait et de lactosérum, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode d'analyse microbiologique décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 5 Safar 1425 correspondant au 27 mars 2004.

Noureddine BOUKROUH.

ANNEXE

Méthode de dénombrement des germe totaux à 30° C pour les poudres de lait et de lactosérum

1°/ Définition :

On appelle « germes totaux », les germes microbiens dénombrés par la présente méthode. Le résultat du dénombrement est exprimé en nombre de germes totaux par gramme de poudre.

2°/ Principe :

On procède à une série de dilution de l'échantillon reconstitué à 47 ± 2° C, que l'on mélange avec le milieu prescrit dans des boîtes de Pétri. Après incubation à 30 °C pendant 72 heures, on compte des colonies.

3°/ Appareillage et verrerie :

3.1 Appareils

3.1.1 Autoclave fonctionnant à 120 °C

3.1.2 Four à air chaud fonctionnant jusqu'à 170 °C.

3.1.3 Etuve bactériologique réglée à une température uniforme de 30 + 1 °C

3.1.4 PH-mètre, avec compensation de température.

3.1.5 Loupe, grossissement 2,5.

3.1.6 Appareil de comptage lumineux.

3.1.7 Compteur - enregistreur.

3.1.8 Bain-marie à 47 + 2 °C.

3.1.9 Balance.

3.2. Verrerie :

Toute la verrerie doit être stérilisable.

3.2.1 Récipient en verre pour la pesée du lait en poudre.

3.2.2 Flacons de dilution d'une contenance de 150 à 200 ml, avec bouchons ou capsules à vis appropriés.

3.2.3 Grands flacons (1000 ml ou plus) pour la préparation du milieu de culture.

3.2.4 Tubes à essai, de 151/15 mm environ, destinés à contenir le milieu culture.

3.2.5 Pipettes graduées (1 et 10 ml)

3.2.6 Boîte de Pétri en verre transparent et incolore de 90 mm environ de diamètre intérieur et de 15 à 20 mm de hauteur la profondeur intérieure doit être de 12 mm minimum. Le fond de cette boîte doit être plat et ne présenter ni irrégularités ni renflements. Les couvercles doivent s'adapter à la boîte.

— On peut utiliser des boîtes de Pétri en matière plastique et des pipettes pré-stérilisées destinées à n'être utilisées qu'une seule fois.

3.2.7 Perles de verres (voir 6.2.1.4).

3.3. Matériels divers :

3.3.1 Entonnoirs de filtration pour la préparation des milieux.

3.3.2 Papiers-filtres rapides s'adaptant aux entonnoirs (3.3.1).

3.3.3 Coton non absorbant, non toxique après stérilisation.

3.3.4 Réactifs pour ajuster le pH.

3.3.4.1 NaOH environ 1 N.

3.3.4.2 HCI environ 1 N.

4°/ Milieu de culture :

4.1 Composition

Extrait de levure..... 2,5 g

Tryptone..... 5,0 g

Glucose..... 1,0 g

Lait écrémé en poudre..... 1,0 g

Gélose..... 10 à15 g

selon les propriétés gélifiantes de la gélose utilisée.

Eau distillée..... 1000 ml
(dans un appareil à distiller en verre).
pH 6,9 ± 0,1.

L'extrait de levure, la tryptone, le glucose, le lait écrémé en poudre et la gélose doivent être de qualité bactériologique.

Le lait écrémé en poudre ne contiendra pas de substances inhibitrices.

4.2 Préparation

4.2.1 Préparation à partir de milieux en poudre.

4.2.1.1 Suivre les instructions du fabriquant mais ajouter du lait écrémé en poudre (cf. 4.1).

4.2.1.2 Si nécessaire, ajuster le pH à 7,0 - 7,1 en utilisant NaOH (1 N) ou HCL (1N).

4.2.2 Préparation à partir d'ingrédients séparés.

4.2.2.1 Dissoudre successivement l'extrait de levure, la tryptone, le glucose et le lait écrémé en poudre dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

4.2.2.2 Ajouter la gélose et porter à ébullition jusqu'à ce que la gélose soit complètement fondue ou chauffer à la vapeur pendant environ 30 minutes.

4.2.2.3 Filtrer sur papier filtre.

4.2.2.4 Ajuster le milieu à un pH de 7,0 - 7,1 en utilisant NaOH (1N) ou HCI (1N).

4.2.3 Répartir par quantités de 10 à 12 ml dans les tubes à essais.

4.2.4 Stériliser pendant 15 minutes dans l'autoclave à 120 °C;

4.2.5 Vérifier le pH du milieu à 45 °C (ce pH doit être de 6,9 ± 0,1).

4.2.6 Le milieu doit être conservé dans l'obscurité, à une température ne dépassant pas 5 °C Prendre soin d'éviter l'évaporation.

5°/ Diluant :

Tous les produits doivent être de qualité analytique.

5.1 Solution de Ringer non diluée.

Composition :

NaCI.....9,00 g

KCI.....0,42 g

Ca CI 2 (anhydre).....0,24 g

NaHCO3.....0,20 g

Eau distillée.....1000 ml

(dans un appareil à distiller en verre)

— On peut utiliser un tampon au citrate (à raison de 15 g de citrate tri-sodique anhydre par 1000 ml) pour les poudres à faible solubilité.

— On peut également employer une solution de peptone à 0,1 % en lieu et place de la solution de Ringer diluée au quart.

5.2 Préparation :

5.2.1 Préparer la solution non diluée de Ringer en dissolvant les sels (5.1) dans l'eau et, avant usage, diluer une partie de cette solution avec trois parties d'eau distillée dans un appareil à distiller en verre pour obtenir une solution de Ringer diluée au quart.

5.2.2 Répartir la solution diluée de façon à obtenir après stérilisation des quantités de 90 ± 2 ml dans les flacons de dilution.

On peut préparer le diluant à partir de tablettes prêtes à l'emploi.

5.2.3 Stériliser pendant 15 minutes dans l'autoclave à 120 °C.

6°/ Méthode :

6.1 Préparation de la verrerie

6.1.1 Toute la verrerie doit être nettoyée soigneusement avant emploi.

6.1.2 Les tubes à essais, les pipettes et les flacons doivent être bouchés avec du coton avant leur stérilisation.

Pour la stérilisation, on peut également envelopper les pipettes dans du papier aluminium ou dans tout autre matériau approprié.

6.1.3 La stérilisation des pipettes et des boites de Pétri s'effectuera de préférence dans un four à air chaud pendant une heure et à une température comprise entre 165 et 170 °C, mais il est également possible de stériliser ce matériel à l'autoclave pendant 120 °C .

Dans ce dernier cas, ne pas fermer les récipients dans lesquels le matériel est stérilisé.

Sécher la verrerie ainsi stérilisée dans l'autoclave ou dans un four à air chaud.

6.2. Préparation des dilutions

6.2.1 Préparation de dilution au 1/10 (reconstitution de la poudre).

6.2.1.1 Réchauffer un flacon contenant 90 ml de diluant à 47 ± 2 °C au bain-marie.

6.2.1.2 Peser 10 g de lait en poudre dans un récipient en verre stérilisé en procédant de façon aseptique.

6.2.1.3 Introduire la poudre dans le flacon de dilution contenant le diluant à 47 ± 2 °C.

6.2.1.4 Pour dissoudre la poudre, la mouiller en faisant tourner lentement puis en secouant doucement le flacon pendant 10 secondes environ, 25 fois avec un mouvement d'une amplitude de 30 cm environ.

Des perles en verre peuvent contribuer à une meilleure reconstitution. Si l'on y recourt, les ajouter au flacon avant stérilisation.

6.2.1.5 Remettre le flacon au bain-marie et le maintenir pendant 5 minutes en agitant de temps à autre le contenu.

6.2.1.6 Agiter une fois et effectuer le dénombrement.

Le volume final du lait reconstitué est d'environ 97,5 ml et non de 100 ml, mais cet écart est négligeable.

6.2.2. Préparation des dilutions au 1/100 et plus.

6.2.2.1 A l'aide d'une pipette stérile transférer 10 ml de lait reconstitué dans 90 ml de diluant stérile en veillant à ne pas enfoncer l'extrémité de la pipette de plus d'un centimètre au-dessous de la surface. On obtient ainsi la dilution au 1/100.

6.2.2.2 Mélanger en agitant 25 fois avec un mouvement d'une amplitude de 50 cm environ.

6.2.2.3 On peut poursuivre les dilutions décimales en utilisant chaque fois une nouvelle pipette pour passer d'une dilution à l'autre comme prévue au 6.2.2.1.

6.3. Ensemencement des boîtes de Pétri.

6.3.1 Préparer au moins deux boîtes à partir de chaque dilution choisie de façon à obtenir au moins deux boîtes comprenant de 20 à 300 colonies.

Normalement il suffit de choisir deux dilutions parmi les dilutions au 1/10, au 1/100 ou au 1/1000, mais si l'on prévoit une énumération trés élevée, il faudra procéder à d'autres dilutions.

6.3.2 Utiliser une nouvelle pipette stérile de 1 ml pour ensemencer 1 ml de chaque dilution dans les boîtes de Pétri.

6.4. Répartition de la gélose dans les boîtes de Pétri

6.4.1 Faire bouillir le milieu et le refroidir aussi vite que possible à une température de 45 à 47 °C.

6.4.2 Verser dans chaque boîte 10 à 12 ml du milieu fondu, refroidir à une température de 45 à 47 °C

6.4.3 Immédiatement après avoir versé le milieu, le mélanger par cinq mouvements de va-et-vient, suivis de cinq mouvements circulaires dans le sens des aiguilles d'une montre suivis de cinq mouvements de va-et-vient exécutés perpendiculairement aux premiers et suivis enfin de cinq mouvements circulaires dans le sens contraire des aiguilles d'une montre.

6.4.4 Laisser reposer les boîtes jusqu'à la solidification du milieu, les retourner et les placer dans l'étuve. Le temps qui s'écoule entre la préparation des dilutions, et la répartition de la gélose dans les boîtes ne doit pas dépasser 15 minutes.

Il importe que les opérations décrites aux points 6.2, 6.3 et 6.4 soient exécutées à l'abri de la lumière.

6.5 Incubation des boîtes de Pétri.

Les boîtes sont mises à incuber, leur fond étant tourné vers le haut à 30 ± 1 °C pendant 72 ± 2 heures ; il est préférable de ne pas les empiler à plus de quatre (maximum six).

Les piles de boîtes ne doivent pas se toucher, ni être en contact avec les parois ou la partie supérieure de l'étuve.

6.6 Numération des colonies

6.6.1 Les colonies doivent être comptées dans les 4 heures qui suivent la fin de la période d'incubation pour faciliter la numération. Il est recommandé d'utiliser un appareil de comptage lumineux muni d'une loupe et d'un compteur-enregistreur.

6.6.2 Ne tenir compte, pour exprimer les résultats, que des boîtes dans lesquelles se sont développées de 20 à 300 colonies.

6.6.3 Calculer la moyenne arithmétique à partir des chiffres obtenus dans les boîtes ensemencées avec la même dilution.

6.6.4 Si les boîtes correspondant à plusieurs dilutions donnent des résultats compris entre ces limites, ne tenir compte que de la moyenne des résultats.

6.6.5 Si une numération dépasse à peine 300 colonies et si la dilution suivante est à peine inférieure à 20 colonies, prendre la moyenne.

6.6.6 Si l'écart est important, recommencer l'épreuve.

6.6.7 Si une boîte a plus du quart de sa surface recouvert de colonies envahissantes, elle doit être écartée.

7°/ Expression des résultats.

7.1 Nombre de germes par g = nombre de colonies déterminées selon le processus exposé en 6.6 multiplié par l'inverse de la dilution. Il n'y a lieu de tenir compte que de deux chiffres significatifs.

7.2 Pour un nombre de trois chiffres, arrondir au zéro le plus proche. Si le troisième chiffre est 5, arrondir au chiffre inférieur si les deux premiers chiffres sont des nombres pairs et au chiffre supérieur si les deux premiers sont des nombres impairs par exemple.

236 240
234 230
235 240
225 220
245 240

7.3 Si les boîtes correspondant à la dilution la plus faible contiennent moins de 20 colonies on considérera que le nombre de germes est inférieur à 20 fois l'inverse de cette dilution.

Si les boîtes correspondant à la dilution la plus levée contiennent plus de 300 colonies, on considérera que le nombre de germes est supérieur à 300 fois l'inverse de cette dilution.

8°/ Répétabilité

La différence entre les résultats de dénombrement faits en double (résultats obtenus simultanément ou rapidement l'un après l'autre par le même opérateur) ne doit pas s'écarter de plus de 30 % du résultat le plus bas.

★

Arrêté du 5 Safar 1425 correspondant au 27 mars 2004 rendant obligatoire la méthode de contrôle microbiologique pour le lait stérilisé.

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 03-215 du 7 Rabie El Aouel 1424 correspondant au 9 mai 2003, modifié, portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n ° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n ° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 29 Safar 1414 correspondant au 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété par l'arrêté interministériel du 25 Ramadhan 1418 correspondant au 24 janvier 1998 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n ° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de contrôle microbiologique pour le lait stérilisé.

Art. 2. — Pour le contrôle microbiologique du lait stérilisé, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode d'analyse microbiologique décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 5 Safar 1425 correspondant au 27 mars 2004.

Noureddine BOUKROUH.

ANNEXE

Méthode de contrôle microbiologique pour le lait stérilisé

1°/ Objet :

Cette méthode est applicable à tous les types de laits stérilisés liquides, entiers, partiellement ou entièrement écrémés et destinés à la consommation en tant que tels, (Ces dispositions excluent les laits concentrés, sucrés ou non ainsi que les laits aromatisés).

2°/ Echantillonnage et préparation des échantillons.

2.1 Echantillonnage

L'échantillonnage (nombre des échantillons et fréquence) doit être basé sur des principes statistiques.

A chaque échantillonnage on doit prélever trois récipients par échantillon excepté dans les pays à climat tempéré où deux récipients par échantillon suffisent.

2.2 Préparation des échantillons

Les récipients doivent être propres et secs avant leur ouverture et avant incubation. Avant d'ouvrir le récipient son contenu doit être bien mélangé (par inversions répétées).

Tous les instruments utilisés pour le prélèvement de portions de lait dans les récipients doivent être propres et stériles.

Toutes les précautions normales de laboratoire doivent être prises pour éviter une contamination des échantillons.

3°/ Contrôle à effectuer avant incubation (sur au moins un des échantillons ou récipients).

3.1 Test de stabilité à l'éthanol.

Mélanger le volume d'une solution aqueuse d'éthanol à 68% (v/v) à un volume de lait. S'il ne se forme pas de précipité, le lait a satisfait à l'épreuve de stabilité à l'éthanol et on doit procéder aux tests ci-après.

3.2 Acidité titrable exprimée en g d'acide lactique pour 100 ml de lait stérilisé.

3.3 Examen microscopique direct.

3.4 Examen organoleptique : présence ou absence de précipité, sédiment, odeur ou saveur anormale.

4°/ Incubation.

(si le lait a satisfait au test de stabilité à l'éthanol)

4.1 Incuber l'un des récipients non ouverts ou l'un des échantillons à 30 ± 1 °C pendant 14 jours.

4.2 Incuber les récipients non ouverts ou l'échantillon restant à 55 ± 1 °C pendant 7 jours.

Dans les climats tempérés, l'incubation à 55 ± 1 °C peut être omise.

5°/ Contrôles à effectuer après incubation

5.1 Test de stabilité à l'éthanol.

Mélanger un volume d'une solution aqueuse d'éthanol à 68% (v/v) à un volume de lait. Si le lait satisfait à l'épreuve de stabilité à l'éthanol on doit procéder aux tests ci-après :

5.2 Acidité titrable, exprimée en g d'acide lactique pour 100 ml de lait.

5.3 Dénombrement des colonies l'inoculum doit être équivalent à 0,1 ml de lait.

5.4 Examen organoleptique; présence ou absence de précipité, sédiment, odeur ou saveur anormale.

6° Exigences imposées pour que l'échantillon puisse être reconnu satisfaisant

6.1/ Avant incubation.

L'échantillon doit satisfaire à l'épreuve de l'éthanol (3.1)

6.2 Après incubation

6.2.1 L'échantillon doit satisfaire à l'épreuve de stabilité à l'éthanol (5.1).

6.2.2 La différence entre l'acidité titrable avant et après incubation ne doit pas être supérieure à 0,02 exprimée en g d'acide lactique pour 100 ml de lait.

6.2.3 La numération des germes ne devra pas dépasser 10 par inoculum (5.3).

6.2.4 L'odeur et la saveur de l'échantillon ne doivent pas être différentes de l'odeur et de la saveur normales d'un lait stérile incubé pendant un laps de temps prolongé.

6.2.5 L'aspect physique doit être normal, on ne doit constater aucune trace de coagulation ou de protéolyse et doit correspondre à celui d'un lait stérilisé ayant subi une incubation prolongée.

7°/ Appréciation de la qualité d'un lot

7.1 Cette opération doit se fonder sur une interprétation statistique des résultats obtenus sur l'échantillon.

———★———

Arrêté du 5 Safar 1425 correspondant au 27 mars 2004 rendant obligatoire la méthode de dénombrement des organismes microbiens pour le lait fermenté.

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 03-215 du 7 Rabie El Aouel 1424 correspondant au 9 mai 2003, modifié, portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 29 Safar 1414 correspondant au 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété par l'arrêté interministériel du 25 Ramadhan 1418 correspondant au 24 janvier 1998 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de dénombrement des organismes microbiens pour le lait fermenté.

Art. 2. — Pour le dénombrement des organismes microbiens du lait fermenté, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode d'analyse microbiologique décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 5 Safar 1425 correspondant au 27 mars 2004.

Noureddine BOUKROUH.

ANNEXE

Méthode de dénombrement des organismes microbiens dans le lait fermenté.

1°/ Définition :

On entend par **« organismes de contamination »** tous microorganismes autres que ceux responsables de fermentations spécifiques du type de lait fermenté considéré.

Les levures faisant partie de la flore spécifique à certains types de laits fermentés ne doivent pas être considérées comme des organismes de contamination.

2°/ Principe

Un échantillon de lait fermenté est ensemencé sur un milieu rendu exempt de glucides qui est incubé à deux reprises; on dénombre ensuite les organismes de contamination.

3°/ Appareillage et verrerie :

Matériel courant de laboratoire.

4°/ Milieu de culture :

Le milieu de culture a la composition suivante :

Gélysate (*) ou équivalent.....7,5 g

Trypticase (*) ou équivalent.....7,5 g

Chlorure de sodium (NaCL).....5,0 g

Gélose (*).....4,0 g

Eau distillée.....1000 ml

Le pH du milieu après stérilisation.....7,6 ± 0,1

(*) rendu exempt de glucides.

5°/ Diluant :

Solution de Ringer au quart.

La composition de la solution concentrée de Ringer est la suivante :

Chlorure de sodium (NaCI).....9,00 g

Chlorure de potassium (KCI).....0,42 g

Chlorure de calcium anydre ($CaCI_2$).....0.24 g

Bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$).....0.20 g

Eau distillée (dans un appareil en verre).....1000 ml

Pour l'emploi, ajouter une partie de la solution précédente à trois parties d'eau distillée (dans un appreil en verre).

— On peut également employer une solution de peptone à 0,1 % au lieu et place de la solution de Ringer diluée au quart.

— On peut également préparer le diluant à partir de tablettes prêtes à l'emploi.

— Tous les réactifs doivent être de qualité analytique.

6°/ Mode opératoire

6.1 Préparation des dilutions

6.1.1 L'échantillon sera conservé dans un réfrigérateur (3 à 4 °C) jusqu'à l'analyse bactériologique qui sera effectuée dans un délai maximum de 24 h après le prélèvement.

6.1.2 Prélever, en s'entourant des précautions aseptiques habituelles, un échantillion de 10 g de lait fermenté qu'on déposera dans un flacon ou récipient approprié, fermé à vis ou bouché, contenant 90 ml d'une solution de Ringer au quart et quelques perles de verre.

— Mélanger soigneusement en agitant le flacon 25 fois de haut en bas avec une amplitude de 30 cm environ.

— Le liquide est à utiliser pour la numération 1 ml correspondant à 100 mg de lait fermenté.

6.1.3 Afin d'obtenir la dilution au 1/100, transférer aseptiquement 1 ml du liquide (6.1.2) à 9 ml de solution de Ringer au quart, en mélangeant. Préparer, si nécessaire, une série de dilutions au 1/1000 à partir de la dilution au 1/100.

6.2 Incubation

On fera incuber les boîtes de Pétri

— d'abord pendant 48 ± 2 heures à 30 ± 1 °C;

— puis pendant 48 ± 2 heures à 20 ± 1 °C.

7° Expression des résultats

Exprimer le résultat du dénombrement en nombre de microorganismes par gramme de lait fermenté, c'est-à-dire le nombre de colonies x inverse de la dilution.

Dans certains cas, les bactéries lactiques donnent naissance à des « points de colonies ». Ces dernières ne doivent pas être comptées comme organismes de contamination. En cas de doute, effectuer l'épreuve de la catalase sur un nombre représentatif de colonies.

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 4 Rabie Ethani 1425 correspondant au 24 mai 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrement des coliformes dans les laits fermentés.

Le ministre du commerce,

Vu le décret exécutif n ° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n ° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n ° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de dénombrement des coliformes dans les laits fermentés.

Art. 2. — Pour le dénombrement des coliformes dans les laits fermentés, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode microbiologique décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 4 Rabie Ethani 1425 correspondant au 24 mai 2004.

Noureddine BOUKROUH.

ANNEXE

Méthode de dénombrement des coliformes dans les laits fermentés

1°/ Définition :

Aux fins de la présente méthode la dénomination « coliforme » s'applique aux bactéries en forme de bacilles Gram négatives, aérobies et facultativement anaérobies, non sporulées fermentant le lactose avec formation de gaz et d'acide.

2°/ Principe :

Trois séries de dilutions en parallèle, obtenues à partir de l'échantillon de lait fermenté, sont ensemencées sur un milieu sélectif au «Brillant Green Lactose Bile Broth» dans des tubes à essais contenant de petits tubes de Durham. On incube les tubes pendant 48 heures à 37 ° C. A partir des tubes positifs (production de gaz dans les cloches de Durham) on détermine le nombre le plus probable de bactéries coliformes par g de lait fermenté en se référant au tableau NPP (nombre le plus probable) pour trois séries parallèles.

3°/ Appareillage et verrerie :

Matériel courant de laboratoire.

4°/ Milieu de culture :

4.1 Composition

La composition du milieu « Brillant Green Lactose Bile Broth» est la suivante :

Peptone ou gélisate..... 10 g

Lactose..... 10 g

Bile de bœuf déshydratée..... 20 g

Vert brillant.....0,0133 g

Eau distillée (dans un appareil en verre)..... 1000 ml

4.2 Préparation

Pour préparer 1000 ml du milieu, dissoudre le peptone et le lactose dans environ 500 ml d'eau distillée. Dissoudre 20 g de bile de bœuf anhydre dans 200 ml d'eau distillée. Le pH de cette solution doit être compris entre 7,0 et 7,5. Mélanger les deux solutions, ajuster le pH mesuré à l'aide d'une électrode de verre, à 7,4 ajouter 13,3 ml d'une solution aqueuse à 0,1% de vert brillant. Le volume est à compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée.

Verser 10 ml de milieu dans les tubes à essais.

Ces tubes sont munis de cloches de Durham. Après le remplissage, stériliser pendant 15 minutes dans des autoclaves réglés à 121 ° C. Après stérilisation, le pH mesuré à l'aide d'une électrode de verre doit être de 7,2 ± 0,1.

5°/ Diluant :

Solution de Ringer au quart.

La composition de la solution concentrée de Ringer est la suivante :

Chlorure de sodium (NACL).....9,00 g

Chlorure de potassium (KCL).....0,42 g

Chlorure de calcium anhydre ($CaCL_2$).....0,24 g

Bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$).....0,20 g

Eau distillée (dans un appareil en verre).....1000 ml

Pour l'emploi, ajouter une partie de la solution précédente à trois parties d'eau distillée (dans un appareil en verre).

La solution diluée sera stérilisée par chauffage pendant 15 minutes à 121° C.

— On peut également employer une solution de peptone à 0,1 % au lieu et place de la solution de Ringer diluée au quart.

— Tous les réactifs doivent être de qualité analytique.

6°/ Mode opératoire :

6.1 Préparation des dillutions

6.1.1 L'échantillon sera conservé dans un réfrigérateur (3 à 4 ° C) jusqu'à l'analyse bactériologique qui sera effectuée dans un délai maximum de 24 h après le prélèvement.

6.1.2 Prélever, en s'entourant des précautions aseptiques habituelles, un échantillon de 10 g de lait fermenté que l'on déposera dans un flacon ou récipient approprié, fermé à vis ou bouché, contenant 90 ml d'une solution de Ringer au quart et quelques perles de verre.

Mélanger soigneusement en agitant le flacon 25 fois de haut en bas avec une amplitude de 30 cm environ.

Le liquide est à utiliser pour la numération; 1 ml correspond à 100 mg de lait fermenté.

6.1.3 Afin d'obtenir la dilution au 1 /100, transférer aseptiquement 1 ml du liquide (6.1.2) à 9 ml de solution de Ringer au quart, en mélangeant. Préparer, si nécessaire, une série de dilutions au 1/1000 à partir de la dilution au 1/100.

6.2. Ensemencement du milieu

6.2.1 Ensemencer les tubes de «Brillant Green Lactose Bile Broth» avec 1 g de lait fermenté et avec les dilutions préparées connues, indiqué en 6.1.3. Mélanger soigneusement, en évitant d'introduire des bulles d'air dans les tubes de Durham.

6.2.2 Ensemencer en parallèle dans trois tubes chaque quantité d'échantillon et chaque dilution; effectuer au moins trois séries, par exemple 1g, 0,1g et 0,01g. En général, on doit prévoir un nombre de dilutions au dixième suffisant pour répondre aux exigences du tableau ci-dessous.

6.3. Incubation

Incuber les tubes ensemencés pendant 48 heures ± 2h à 30°C ± 1° C;

6.4. Détermination du nombre le plus probable de bactéries coliformes

Le test est considéré comme positif lorsqu'il y a production visible de gaz dans les tubes de Durham. Le nombre de tubes positifs est déterminant pour la lecture du nombre le plus probable (NPP) de bactéries coliformes selon le tableau ci-dessous pour trois séries parallèles.

NOMBRE LE PLUS PROBABLE (NPP) POUR TROIS SERIES PARALLELES

Index Tubes positifs de			NPP (pour 10 g)	Index Tubes positifs de			NPP (pour 10 g)
10 g	1,0 g	0,1 g		10 g	1,0 g	0,1 g	
0	0	0	0	2	2	3	4,0
0	0	1	0,3	2	3	0	3,0
0	1	0	0,3	2	3	1	3,5
0	1	1	0,6	2	3	2	4,0
0	2	0	0,6	3	0	0	2,5
1	0	0	0,4	3	0	1	4,0
1	0	1	0,7	3	0	2	6,5
1	0	2	1,1	3	1	0	4,5
1	1	0	0,7	3	1	1	7,5
1	1	1	1,1	3	1	2	11,5
1	2	0	1,1	3	1	3	16,0
1	2	1	1,5	3	2	0	9,5
1	3	0	1,6	3	2	1	15,0
2	0	0	0,9	3	2	2	20,0
2	0	1	1,4	3	2	3	30,0
2	0	2	2,0	3	3	0	25,0
2	1	0	1,5	3	3	1	45,0
2	1	1	2,0	3	3	2	110,0
2	1	2	3,0	3	3	3	140,0
2	2	0	2,0				
2	2	1	3,0				
2	2	2	3,5				

Le NPP détermine le nombre de bactéries coliformes dans la quantité de lait fermenté (en règle générale 1 g ou 0,1 g ou 0,01 g) ayant servi à ensemencer en parallèle les trois premiers tubes à partir desquels on constitue l'index.

Le nombre de bactéries coliformes sera exprimé par le nombre le plus probable (NPP) par g de lait fermenté. Si tous les tubes sont positifs, il faut répéter l'analyse en utilisant des dilutions plus élevées (par exemple 0,1 g, 0,01 g et 0,001 g ou encore plus élevées).

Si l'on trouve un chiffre-index ne figurant pas dans le tableau NPP, on peut en conclure qu'une erreur a été commise dans le mode opératoire.

7°/ Expression des résultats

(NPP) Les résultats sont exprimés en tant que nombre le plus probable de bactéries coliformes par g du produit, selon les indications du tableau.

8°/ Répétabilité

Les différences entre les résultats de détermination effectuées en double (résultats obtenus simultanément ou rapidement l'un après l'autre par le même analyste) ne doit pas s'écarter de plus de 30% du résultat le plus bas.

Arrêté du 4 Rabie Ethani 1425 correspondant au 24 mai 2004 rendant obligatoire une méthode de recherche des staphylocoques à coagulase positive pour le lait en poudre.

Le ministre du commerce,

Vu le décret exécutif n ° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n ° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n ° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de recherche des staphylocoques à coagulase positive pour le lait en poudre.

Art. 2. — Pour la recherche des staphylocoques à coagulase positive pour le lait en poudre. les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode d'analyse microbiologique décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 4 Rabie Ethani 1425 correspondant au 24 mai 2004.

Noureddine BOUKROUH.

ANNEXE

RECHERCHE DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE DANS LE LAIT EN POUDRE

1°/ Principe :

On inocule le lait reconstitué correspondant à 0,1g de poudre dans des bouillons d'enrichissement (dans celui de Giolitti et Cantoni ou, s'il s'agit de poudres fabriquées depuis moins de 15 jours, dans le bouillon salé lactosé au rouge de phénol). Après incubation, on repique les tubes sur milieu E.T.G.P.A de Baird-Parker (3.3). Les colonies de staphylocoques qui se développent sur le milieu de Baird-Parker sont soumises à l'épreuve de la coagulase.

2°/ Reconstitution du lait en poudre et préparation des dilutions.

La reconstitution du lait en poudre et la préparation des dilutions se font selon les conditions appropriées.

3°/ Formules des milieux et directives pour leur préparation.

3.1 Milieu de Giolitti et Cantoni

3.1.1 Milieu de base

Tryptone.....10 g
Extrait de viande.....5 g
Extrait de levure.....5 g
Chlorure de lithium.....5 g
Mannitol.....20 g
Chlorure de sodium.....5 g
Glycine.....1,2 g
Pyruvate de sodium.....3 g
Eau distillée.....1000 ml

Faire dissoudre les produits dans l'eau en chauffant et en agitant pour obtenir une dissolution complète. Refroidir à 50-60 °C et ajuster le pH à 6,9 ± 0,1. Répartir à raison de 19 ml dans des tubes de 20 x 200. Autoclaver 20 mn à 115 °C. Avant utilisation, chasser l'air par chauffage à 100 °C pendant 20 mn. Refroidir.

3.1.2 Solution de tellurite de potassium

Tellurite de potassium.....1 g
Eau distillée.....100 ml

Dissoudre le tellurite de potassium dans l'eau. Stériliser par filtration.

On devra s'assurer au préalable, par des essais bactériologiques, que le tellurite de potassium dont on dispose convient pour cet usage. Il est recommandé en toute circonstance de porter grande attention et il faut souligner l'importance d'un choix judicieux de ce produit en ce qui concerne son origine et les garanties qu'il offre.

3.1.3 On prépare en outre une gélose à 2% (dans l'eau distillée) que l'on stérilise à l'aucolave (20 mn à 120 °C) et qui sert à former un bouchon anaérobie au-dessus du milieu liquide (voir 4.1).

3.1.4 Mode d'emploi

Juste avant l'utilisation, chauffer les tubes de milieu de base (3.1.1) pendant 20 mn à 100 °C pour chasser l'air. Refroidir à 45 °C et ajouter 0,1 ml de la solution de tellurite de potassium (3.1.2).

3.2 Bouillon salé lactosé au rouge de phénol

Extrait de viande de bœuf.....1,5 g
Protéose-peptone.....7,5 g
Chlorure de sodium.....75 g

Lactose.....7,5 g
Rouge de phénol.....0,025 g
Eau distillée.....1000 ml

Faire dissoudre les produits dans l'eau en chauffant et en agitant pour obtenir une dissolution complète. Refroidir à température ambiante et ajuster le pH à 7,4 ± 0,1. Répartir à raison de 9 ml dans des tubes de 18 x 180. Autoclaver 20 mn à 120 °C.

3.3 Milieu E.T.G.P.A. de Baird-Parker

3.3.1 Milieu de base

Tryptone.....10 g
Extrait de bœuf.....5 g
Extrait de levure.....1 g
Chlorure de lithium.....5 g
Gélose.....15 à 20 g
(selon le pouvoir gélifiant de la gélose utilisée)
Eau distillée.....1000 ml

Faire dissoudre les produits dans l'eau en chauffant et en agitant pour obtenir une dissolution complète. Refroidir à 50-60 °C et ajuster le pH à 6,8 ± 0,1.

Répartir à raison de 90 ml dans des flacons col à vis bouchés bakélite. Autoclaver 15 mn à 120 °C.

3.3.2 Solution de glycine

Glycine..... 20 g
Eau distillée.....100 ml
Après complète dissolution, autoclaver 15 mn à 120 °C.

3.3.3 Solution de tellurite de potassium

Tellurite de potassium.....1 g
Eau distillée.....100 ml

Après complète dissolution, stériliser par filtration. On devra s'assurer au préalable, par des essais bactériologiques, que le tellurite de potassium dont on dispose convient pour cet usage. Il est recommandé en toute circonstance de porter grande attention et il faut souligner l'importance d'un choix judicieux de ce produit en ce qui concerne son origine et les garanties qu'il offre.

3.3.4 Emulsion de jaune d'œuf

Tremper des œufs frais une minute environ dans une dilution (1+1000) d'une solution saturée de $HgCI_2$.

Briser les coquilles aseptiquement et séparer les jaunes des blancs. Mélanger les jaunes avec une solution saline physiologique (3+7, v/v) pendant 5 secondes environ dans un mélangeur à grande vitesse.

3.3.5 Mode d'emploi

A 90 ml de milieu de base préalablement fondu et maintenu à 45 °C ± 1 °C, ajouter aseptiquement les solutions suivantes amenées à 45 °C :

a) 6,3 ml de la solution de glycine (3.3.2) ;
b) 1 ml de la solution de tellurite de potassium (3.3.3) ;
c) 5 ml d'émulsion de jaune d'œuf (3.3.4) ;

Bien mélanger les préparations a, b et c dans le milieu fondu et répartir immédiatement en boîtes de Pétri à raison de 15 ml par boîte.

Ces boîtes coulées peuvent être conservées 48 heures à + 4 °C. Immédiatement avant l'utilisation, étendre sur la surface des boîtes 0,5 ml d'une solution à 20% (p/v) de pyruvate de potassium stérilisée par filtration, sécher les boîtes à 50 °C en position horizontale, la surface de la gélose en dessus. Inoculer les boîtes dès qu'elles sont sèches.

Conserver la solution de pyruvate à 3-5 °C et la remplacer chaque mois.

4°/ Mode opératoire

4.1 Si la fabrication de la poudre de lait a été faite plus de 15 jours avant l'analyse, ou si elle est de date inconnue ajouter 1ml de lait reconstitué correspondant à 0,1 g de poudre de lait dans un tube de bouillon d'enrichissement de Giolitti et Cantoni (3.1.4).

Bien mélanger l'inoculum avec le milieu en évitant toute introduction d'air. On coule ensuite au-dessus du milieu un bouchon de gélose à 2% (3.1.3) fondue et on laisse solidifier.

4.2 S'il s'agit de poudres fabriquées depuis moins de 15 jours ajouter 1 ml de lait reconstitué dans un tube de bouillon salé lactose au rouge de phénol (on peut utiliser également le milieu de Giolitti et Cantoni comme en 4.1).

4.3 Incuber pendant 24 h à 37 °C l'un et/ou l'autre des milieux d'enrichissement ensemencés (c'est-à-dire 4.1 et/ou 4.2).

4.3.1 Repiquer selon 4.6 et 4.7 les tubes de bouillon d'enrichissement de Giolitti et Cantoni présentant un noircissement ou un précipité noirâtre.

4.3.2 Repiquer selon 4.7 les tubes de bouillon salé lactosé au rouge de phénol ayant viré au jaune.

4.4. Incuber les autres tubes 24 h supplémentaires et les repiquer selon 4.6 et 4.7.

4.5 Le procédé pour repiquer les tubes de bouillon d'enrichissement après leur incubation est donné en 4.6 et 4.7.

4.6 Dans le cas du milieu de Giolitti et Cantoni, enlèvement du bouchon de gélose selon la technique suivante :

Avec une spatule, découper le bouchon de gélose selon deux diamètres perpendiculaires et, si nécessaire, passer ensuite la spatule autour du bouchon.

Placer le tube sur l'agitateur de façon à faire tomber les morceaux de bouchon au fond du tube et, en même temps, mettre les bactéries en suspension.

4.7 Avec une anse de platine, prélever environ 0,001 ml de culture développée dans le bouillon d'enrichissement, étaler à la surface d'une boîte renfermant le milieu E.T.G.P.A. de façon à obtenir des colonies séparées.

4.8 Incuber les boîtes retournées 24 h à 37 °C ± 1 °C.

4.9 Soumettre au moins 3 colonies typiques à l'épreuve de la coagulase (4.12). Les colonies typiques de staphylococcus aureus sont noires, brillantes avec une mince bordure blanche et entourées d'une zone claire s'étendant dans le milieu opaque.

4.10 Si au bout de 24 h aucun développement ne s'est produit ou si l'on observe seulement des colonies atypiques, incuber 24 h supplémentaires à 37 °C ± 1 °C.

4.11 Si des colonies se sont développées (d'après 4.10) en soumettre trois au moins à l'épreuve de la catalase. Pour cela prendre, avec un fil de platine une partie de chacune de ces colonies et la mélanger sur une lame à une goutte d'eau oxygénée à 3,0% (10 volumes). Si l'on observe une production de gaz, soumettre la colonie correspondante à l'épreuve de la coagulase (selon 4.12).

4.12 Epreuve de la coagulase

4.12.1 Inoculer chaque colonie dans un petit tube contenant 0,3 ml de bouillon cœur/cervelle stérille. Incuber 20-24 h à 37 °C ± 1 °C.

4.12.2 Ajouter dans un petit tube 0,1 ml de cette culture à 0,3 ml de plasma de lapin additionné de 0,1 % d'E.D.T.A.

4.12.3 Incuber à 37 °C ± 1 °C et examiner les tubes en vue de la formation d'un coagulum, chaque heure pendant 4 h, puis après 24 h.

5. Conclure à la présence de staphylocoques à coagulase positive dans l'échantillon de poudre de lait, si trois colonies au moins obtenues selon 4.9 ou 4.11 coagulent le plasma de lapin.

★

Arrêté du 4 Rabie Ethani 1425 correspondant au 24 mai 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrement des micro-organismes caractéristiques par une technique de comptage des colonies à 37° C dans le yaourt.

Le ministre du commerce,

Vu le décret exécutif n ° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n ° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 16 Joumada Ethania 1419 correspondant au 7 octobre 1998 relatif aux spécifications techniques des yaourts et aux modalités de leur mise à la consommation ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n ° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de dénombrement des micro-organismes caractéristiques par la technique de comptage des colonies à 37 ° C dans le yaourt.

Art. 2. — Pour le dénombrement des micro-organismes caractéristiques par la technique de comptage des colonies à 37° C dans le yaourt, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode d'analyse microbiologique décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 4 Rabie Ethani 1425 correspondant au 24 mai 2004.

Noureddine BOUKROUH.

ANNEXE

Méthode de dénombrement des micro-organismes caractéristiques par une technique de comptage des colonies à 37° C dans le yaourt

Objet et domaine d'application

La méthode est applicable aux yaourts dans lesquels deux micro-organismes caractéristiques sont présents et vivants.

1°/ Définition

1.1 Lactobacillus bulgaricus : micro-organisme thermophile formant des colonies lenticulaires souvent en forme d'étoile, de 1 à 3 mm de diamètre, sur milieu MRS acidifié (selon DeMan, Rogosa et Sharpe)

Aspect microscopique : bâtonnets généralement courts, mais quelquefois de forme allongée. Ils sont non sporulés, grampositifs, non mobiles, catalase négative.

1.2 Streptococcus thermophilus : micro-organisme thermophile formant des colonies lenticulaires de 1 à 2 mm de diamètre sur M 17. Aspect microscopique : cellule sphérique ou ovoïde (Cocci) (0,7 - 0,9 µm de diamètre), par paire ou en chaînes longues. Elles sont gram positives-catalase négatives.

2°/ Principe

2.1 Ensemencement des dilutions décimales de l'échantillon dans :

— milieu MRS acidifié, suivi d'une incubation en anaérobiose pendant 72 h à 37 ° C, pour le dénombrement de ***L bulgaricus,***

— milieu M 17, suivi d'une incubation en aérobiose pendant 48 h à 37 ° C, pour le dénombrement de **S. thermophilus.**

2.2 Comptage des colonies et confirmation par tests appropriés.

2.3 Calcul du nombre de micro-organismes

Calcul du nombre de micro-organismes caractéristiques par gramme d'échantillon à partir du nombre de colonies obtenu sur les boîtes sélectionnées à des dilutions permettant de donner un résultat significatif.

3°/ Diluants, milieux de culture et réactifs

3.1 Composants de base

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation du diluant, des composants de base déshydratés ou une préparation complète déshydratée.

Les prescriptions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les réactifs chimiques doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée dans le verre ou désionisée exempte de substances susceptibles d'influer sur la croissance des micro-organismes dans les conditions de l'essai :

— il convient de vérifier cet aspect périodiquement, particulièrement dans le cas de l'eau déminéralisée,

— il convient d'utiliser des solutions d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique (environ 0,1 mol/l) afin d'ajuster le pH des diluants, sauf indication contraire.

3.2 Diluant

Composition

Peptone 1 (hydrolysat tryptique de caséine) ..... 0,5 g
Peptone 2 (hydrolysat tryptique de viande) ..... 0,5 g
Eau ..... 1000 ml

Préparation

Dissoudre les peptones dans l'eau. Répartir la solution par ml dans des flacons de 150 ml de capacité.
Stériliser à 121° C pendant 15 mn.

On peut employer des polypeptones qui sont des mélanges de peptone 1 et peptone 2.

3.3 Milieux de culture

3.3.1 Milieu MRS acidifié

Composition

Peptone 1 ..... 10 g
Extrait de viande ..... 10 g
Extrait de levure déshydraté ..... 5 g
Glucose (c_6 H $_{12}$ 0_6) ..... 20 g
Tween 80 (sorbitanne monoléate) ..... 1 ml
Hydrogéno-orthophosphate dipotassique
(K_2HPO_4) ..... 2 g
Acétate de sodium, trihydraté
(CH_3CO_2 Na_3H_2O) ..... 2 g
Citrate d'ammoniaque ($C_6H_60_7(NH_4)_2$)..... 2 g
Sulfate de magnésium heptahydraté
(MnSO $_4$7H_2o) ..... 0,2 g
Sulfate de manganèse tétrahydraté
(MnSO $_4H_2$0) ..... 0,05 g
Agar-agar..... 9-18 g
Eau ..... 1000 ml

Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau en ébullition.

Laisser refroidir à 5 ° C et ajuster le pH à l'aide d'acide acétique (3.4.3) en contrôlant avec le pH-mètre (4.1.8) de sorte qu'après stérilisation il soit de 5,4 à 25° C.

Répartir le milieu par quantité de 100 ml dans des flacons de 150 ml ou par quantité de 200 ml dans des flacons de 250 ml. Stériliser à 121° C pendant 15 mn.

On peut également utiliser les milieux MRS prêts à l'emploi, dans ce cas, il faut les contrôler avec le milieu préparé d'après la présente méthode.

Avant de commencer l'examen bactériologique, faire fondre complètement la quantité nécessaire de milieu dans un bain-marie en ébullition ou en vapeur dans un récipient partiellement fermé. Refroidir le milieu fondu dans le bain-marie (4.1.7).

Pour contrôler la température de la gélose, il est recommandé de placer un thermomètre dans un même volume de solution de gélose à la même concentration que celle du milieu, contenue dans un récipient séparé, identique à celui utilisé pour le milieu. Cette solution servant au contrôle de la température doit être soumise aux mêmes conditions de chauffage et de refroidissement que le milieu proprement dit.

3.3.2 Milieu M17

3.3.2.1 Milieu de base

Composition

Peptone 1 (hydrolysat trypsique de caséine).....2,50 g
Peptone 2 (hydrolysat pepsique de viande).....2,50 g
Peptone 3 (hydrolysat papaenique de soja).....5,00 g
Extrait de levure déshydratée.....2,50 g
Extrait de viande.....5,00 g

B-glycérophosphate (sel disodique) ($C_3H_7O_6PNa_2$) ..... 19,00 g

Sulfate de magnésium heptahydraté ($MgSO_47H_20$) ..... 0,25 g

Acide ascorbique ($C_6H_8O_6$).....50 g

Agar-agar.....9-18 g

Eau.....950 ml

Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau en ébullition. Laisser refroidir à 50 ° C et ajuster le pH à l'aide des réactifs (3.4) en contrôlant avec le pH-mètre (4.1.8), de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,1 à 7,2 à 25 ° C. Répartir le milieu par quantité de 95 ml dans des flacons de 150 ml. Stériliser à 121° C pendant 15mn.

On peut également utiliser des milieux complets M17 prêts à l'emploi qu'il convient de contrôler avec le milieu M17 préparé d'après la présente méthode.

3.3.2.2 Solution de lactose

Composition

Lactose ($C_{12}H_{22}O_{11}$).....10 g
Eau.....100 ml

Préparation

Dissoudre le lactose dans l'eau, stériliser à 121 ° C pendant 15 mn.

3.3.2.3 Milieu complet

Composition

Milieu de base (3.3.2.1).....95 ml
Solution de lactose (3.3.2.2).....5 ml

Préparation

Immédiatement avant emploi, faire fondre le milieu de base (3.3.2.1) dans un bain-marie en ébullition et laisser refroidir à 48-50 ° C. Chauffer la solution de lactose (3.3.2.2) à 48-50° C.

Ajouter la solution de lactose au milieu de base et mélanger soigneusement par des mouvements rotatifs. Refroidir le milieu dans le bain-marie (4.1.7).

3.4 Réactifs pour ajuster le pH

3.4.1 Hydroxyde de sodium (NaOH) , solution environ 0,1 mol/1.

3.4.2 Acide chlorhydrique (HCI) , solution environ (0,1 mol/1.

3.4.3 Acide acétique (CH_3COOH), 100% (glacial).

4e/ Appareillage et verrerie

4.1 Le matériel de laboratoire microbiologique courant, matériel requis pour la préparation des échantillons et des dilutions.

4.1.1 Incubateur 37 ± 1°C.

4.1.2 Incubateur anaérobie, pouvant être réglé à 37 ± 1° C, ou récipients de culture anaérobie, fournissant une atmosphère de 90% d'azote et 10% de dioxyde de carbone.

4.1.3 Mélangeur, soit de type péristaltique avec récipients stériles en plastique, soit de type rotatif, pouvant fonctionner à une vitesse minimale de rotation de 20000 mn avec récipients en verre ou en métal de capacité appropriée.

4.1.4 Agitateur de tubes à essais (par exemple, agitateur vortex).

4.1.5 Matériel de comptage de colonies, comportant un système d'éclairage avec fond noir, muni d'une loupe grossissant 1,5 fois et d'un compteur numérique mécanique ou électronique.

4.1.6 Loupe grossissement 8-10 fois.

4.1.7 Bain-marie pouvant être réglé à 45 ± 1° C.

4.1.8 PH-mètre, avec compensation de température, d'une précision de ± 0,1 unité de pH à 25° C.

4.1.9 Fioles de dilution, de capacité de 150 - 250 ml et tubes à essais de 18 mm x 180 mm, munis de dispositifs de fermeture appropriés, capsules ou bouchons en caoutchouc ou en matière synthétique.

4.1.10 Pipettes graduées jusqu'à la pointe, pouvant délivrer 1 ml ± 0,02 ml ou 10 ml ± 0,2 ml ou 11 ml ± 0,2 ml.

4.1.11 Boites de Pétri à fond de diamètre intérieur d'environ 90 mm. La profondeur intérieure doit être de 10 mm minimum.

Le fond ne doit présenter aucune irrégularité susceptible d'influer sur le dénombrement des colonies.

4.1.12 Spatules en verre ou en métal.

5e/ Echantillonnage

L'échantillonnage se fait dans des conditions appropriées.

6e/ Mode opératoire

6.1 Préparation de l'échantillon et de la prise d'essai

Avant d'ouvrir le pot de yaourt, et afin d'éliminer toute source de contamination, prendre soin de nettoyer soigneusement la surface extérieure du récipient autour de la zone d'où sera prélevé l'échantillon. Le nettoyage peut être effectué avec de l'éthanol à 70% (VIV), afin d'éviter toute contamination supplémentaire. Ouvrir le pot aseptiquement.

Pendant cette étape, il est important d'obtenir non seulement une dilution homogène, mais aussi une fragmentation des chaînes de streptocoques et de lactobacilles en cellules isolées ou en chaînes courtes, de sorte que les résultats, exprimés en nombre total de micro-organismes vivants par gramme de produit soient reproductibles et représentatifs.

6.1.1 Yaourts sans fruits

Mélanger avec soin le contenu du pot de yaourt à l'aide d'une spatule stérile (4.1.12). Peser 10 ± 0,1 g de l'échantillon de yaourt dans un récipient approprié (par exemple un tube de centrifugeuse de 200 ml à fond rond en verre renforcé, ou le bol du mélangeur, ou encore le récipient en plastique du mélangeur péristatique (4.1.3).

6.1.2 Yaourts aux fruits

Mélanger le contenu total du pot de yaourt pendant 1 minute à l'aide du mélangeur (4.1.3).

Peser 10 ± 0,1 g de l'échantillon de yaourt, comme, 6.1.1.

6.2 Examen microscopique

Effectuer un examen préliminaire de plusieurs champs microscopiques d'un frottis de l'échantillon de yaourt, préalablement coloré au bleu de méthylène (par exemple à l'aide d'une solution éthanolique de bleu de méthylène de 6 g/l) afin d'apprécier la densité des deux types de bactéries, coques et bâtonnets, et choisir ainsi la gamme appropriée de dilutions à utiliser pour le dénombrement de chaque type.

6.3 Préparation de la première dilution

Les opérations décrites aux paragraphes 6.3 à 6.5.4 ne doivent pas être réalisées à la lumière directe du soleil

Ajouter le diluant (3.2) à la prise d'essai (6.1.1) jusqu'à ce que la masse de la prise d'essai et du diluant soit de 50 g. Mélanger pendant 1 minute à l'aide du mélangeur (4.1.3). Compléter à 100 g avec le même diluant. Une dilution 10^{-1} est ainsi obtenue.

6.4 Préparation des dilutions décimales

Répartir le diluant (3.2) à l'aide d'une pipette graduée stérile. Transférer 1 ml de cette dilution dans un deuxième tube, etc.... en s'assurant qu'une nouvelle pipette est utilisée pour chaque dilution, jusqu'à ce que la série de dilutions nécessaires soit obtenue.

Ne pas plonger la pipette plus de 1 cm au-dessous de la surface du liquide. Eviter les bulles d'air en remplissant la pipette. Pendant le transfert ne pas plonger la pipette dans le nouveau diluant.

6.5 Ensemencement et incubation

6.5.1 En opérant en double (pour *L. buigaricus et S. thermophilus)*, transférer à l'aide d'une pipette stérile 1 ml de chaque dilution dans les boîtes de Pétri (4.1.11).

6.5.2 Pour *L. bulgaricus*, verser 12 à 15 ml du milieu MRS acidifié (3.3.1) fondu et maintenu à 45 ° ± 1° C dans un bain-marie (4.1.7), dans chaque boîte de Pétri.

Le temps qui s'écoule entre l'ensemencement des dilutions et le remplissage des boîtes de Pétri avec la gélose ne doit pas être supérieur à 15 minutes (6.5.2 et 6.5.3).

6.5.3 Pour *S. thermophilus,* filtrer 12 - 15 ml du milieu M17 (3.3.2), fondu et maintenu à 45 ° C (4.1.7) dans chaque boîte de Pétri.

6.5.4 Immédiatement après l'avoir versé dans les boîtes, mélanger soigneusement l'inoculum avec le milieu par rotation des boîtes. Laisser le mélange se solidifier en laissant les boîtes sur une surface fraîche et horizontale.

6.5.5 Incuber les boîtes de Pétri retournées. Ne pas empiler plus de 6 boîtes. Les piles de boîtes ne doivent pas se toucher ni être en contact avec les parois ou la partie supérieure de l'incubateur.

6.5.5.1 Incuber les boîtes pour le dénombrement de *L. bulgarius* pendant 72 h à 37 ° C dans l'incubateur anaérobie ou le récipient de culture en anaérobiose (4.1.2).

6.5.5.2 Incuber les boîtes pour le dénombrement de *S. thermophilus* pendant 48 h à 37 ± 1° C.

6.6 Comptage des colonies

A l'issue de la période d'incubation spécifiée (6.5.5.1) et (6.5.5.2), compter les colonies montrant les caractéristiques de chacun des 2 micro-organismes (1.1 et 1.2) sur les boîtes contenant entre 10 et 300 colonies. Examiner les boîtes en lumière tamisée. Pour faciliter le comptage, on peut utiliser un compteur approprié (4.1.5). Eviter de confondre des particules non dissoutes d'échantillon ou des matières précipitées avec des colonies de la taille d'une pointe d'épingle. Examiner les colonies douteuses avec soin, à l'aide d'une loupe de grossissement plus fort si nécessaire, afin de distinguer les colonies des particules étrangères. Procéder à des dilutions dans le cas où le nombre de colonies dépasse 300.

6.7 Confirmation

Sélectionner des colonies à partir des boîtes utilisées pour le dénombrement de telle façon que le nombre retenu soit égal à la racine carrée du nombre total de colonies.

Réaliser une coloration de Gram sur ces colonies et confirmer qu'elles se présentent sous forme de bâtonnets non sporulés, Gram positif, catalase-négative dans les cas des cultures sur milieu MRS, et qu'elles forment des chaînes de coques ou de diplocoques Gram-positif, catalase-négative, dans le cas des cultures sur milieu M17.

7°/ Expression des résultats

7.1 Méthode de calcul

7.1.1 Retenir les dénombrements de boîtes contenant entre 10 et 300 colonies, obtenues en 6.6.

7.1.2 Pour chaque micro-organisme caractéristique, le nombre de micro-organismes par gramme d'échantillon est égal à :

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0{,}1 + n_2)\, d}$$

$\sum$ **C** est la somme des colonies comptées sur les boîtes en 7.1.1 ;

$\mathbf{n_1}$ est le nombre de boîtes comptées à la dilution la plus faible ;

$\mathbf{n_2}$ est le nombre de boîtes comptées à la dilution la plus élevée ;

d est la valeur correspondant à la dilution à partir de laquelle les premiers dénombrements ont été retenus.

S'il y a plus de deux dilutions à compter, la formule doit être modifiée pour prendre en compte la dilution suivante :

Ainsi pour trois dilutions :

$$\frac{\Sigma C}{(n_1 + 0{,}1 n_2 + 0{,}0\ 1)\ d}$$

7.1.3 Arrondir les résultats obtenus en 7.1.2 à deux chiffres significatifs. Pour un nombre de 3 chiffres, arrondir le 3ème chiffre au zéro le plus proche. Si le 3ème chiffre est 5, arrondir au chiffre inférieur dans le cas où les 2 premiers chiffres forment un nombre pair, et au chiffre supérieur dans le cas où les 2 premiers chiffres forment un nombre impair.

par exemple :

pour 234 arrondir à 230

235	240
225	220
245	240

7.1.4 Si tous les dénombrements sont inférieurs à 10, indiquer que le nombre de micro-organismes par gramme est inférieur à 10 x 1/d, "d" étant la valeur correspondant à la dilution la plus faible.

7.1.5 Si tous les dénombrements sont supérieurs à 300, calculer un nombre estimé à partir des boîtes ayant un nombre de colonies le plus proche de 300 et le multiplier par l'inverse de la valeur correspondant à la dilution la plus élevée. Donner le résultat sous la forme : " Nombre estimé de micro-organismes par gramme" dans le cas le plus faible.

7.1.6 Le résultat est exprimé par un nombre compris entre1,0 et 9,9 mutiplié par 10x, x étant la puissance appropriée de 10.

7.1.7 Le nombre total de micro-organismes carctéristiques par gramme de yaourt est égal à :

$$N_L + N_S$$

où :

N_L : est le nombre de *L. bulgaricus* par gramme, calculé selon 7.1.2.

N_S : est le nombre de *S. thermophilus* par gramme, calculé selon 7.1.2.

7.2 Exemple de calcul

Pour un échantillon donné de yaourt, les numérations de *L. bulgaricus* donnent le résultat suivant (2 boites de Pétri par dilution, ont été incubées).

Dilution 10^5 : 295 et 245 colonies ;

10^{-6} : 33 et 40 colonies ;

$$\frac{\Sigma C}{(n_1 + 0{,}1\ n_2)\ d} = \frac{295 + 245 + 33 + 40}{(2 + 0{,}1 \times 2)\ 10^{-5}}$$

$$= \frac{613}{2{,}2 \times 10^{-5}} = 278{,}6 \times 10^{-5}$$

Selon 7.1.3 cela correspondant à 280 x 10^5

Le nombre estimé de *L.bulgaricus* présents dans l'échantillon de yaourt est donc 2,8 x 10^7/g.

De même pour *S.thermophilus*, le nombre estimé est de 4,9 x 10^8/g de yaourt.

Ainsi le nombre total de micro-organismes caractéristiques par gramme de yaourt est égal à :

$(2{,}80 \times 10^7) + (4{,}90 \times 10^8) = 5{,}18 \times 10^8$

qui, arrondi selon 7.1.3, donne :

$5{,}20 \times 10^8$ /g de yaourt.

7.3 Précision

L'expérience montre que si sur deux essais indépendants, réalisés sur le même échantillon, celui donnant les résultats les plus élevés dépasse fréquemment de 30% celui donnant les résultats les plus faibles, l'analyste devra revoir ses conditions opératoires pour déterminer les sources d'erreurs.

8°/ Notes sur le mode opératoire

Sélectivité des milieux de culture

— Aucun des deux milieux de culture recommandés (MRS acidifié et M17) n'est entièrement sélectif. La plupart des souches de *S.thermophilus* ne forment pas de colonies visibles sur milieu MRS acidifié aux dilutions normalement utilisées pour le dénombrement de *L. bulgaricus*. Toutefois, lorsque le nombre de *lactobacilles* dans l'échantillon de yaourt est considérablement plus faible que le nombre de streptocoques des dilutions faibles doivent être réalisées pour le dénombrement de *L.bulgaricus*.

— Dans ces conditions, quelques *S.thermophilus* peuvent former de trés petites colonies ou des colonies de la taille d'une pointe d'épingle sur les boîtes de milieu MRS acidifié; ces colonies sont faciles à distinguer à l'œil nu des colonies de *L.bulgaricus* qui sont de taille plus grande.

— Par ailleurs, la plupart des souches de *L. bulgaricus* ne forment pas de colonies visibles sur le milieu M17 aux dilutions normalement utilisées pour le dénombrement de *S.thermophilus.*

— Des souches de *L.bulgaricus* peuvent cependant former de petites colonies de la taille d'une pointe d'épingle sur le milieu M17, généralement avec des échantillons de yaourt ayant un nombre beaucoup plus élevé de *lactobacilles* que de streptocoques.

— Ces petites colonies rugueuses ont généralement un aspect laineux ou cotonneux et peuvent facilement être distinguées à l'œil nu (et encore mieux à la loupe) des colonies lisses et lenticulaires de *S.thermophilus* qui sont plus grandes.

ARRETES, DECISIONS ET AVIS

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004 rendant obligatoire une méthode de préparation des échantillons pour essai et dilutions en vue de l'examen microbiologique.

Le ministre du commerce,

Vu le décret exécutif n ° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n °02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 29 Safar 1414 correspondant au 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n ° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de préparation des échantillons pour essai et dilutions en vue de l'examen microbiologique.

Art. 2. — Pour la préparation des échantillons pour l'essai et les dilutions en vue de l'examen microbiologique, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004.

Noureddine BOUKROUH.

ANNEXE

METHODE DE PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR ESSAI ET DILUTIONS EN VUE DE L'EXAMEN MICROBIOLOGIQUE

1. **Définition**

Pour les besoins de la présente méthode, les définitions suivantes s'appliquent.

1.1 Dilution primaire (suspension mère) Suspension, solution ou émulsion obtenue après qu'une quantité pesée ou mesurée du produit à analyser (ou de l'échantillon pour essai préparé à partir de ce produit) ait été mélangée, si nécessaire en utilisant un homogénéisateur et en observant des précautions appropriées (6), avec neuf fois la même quantité de diluant (3), en laissant les grosses particules se déposer, si elles existent.

Il peut être nécessaire dans certains cas notamment pour les produits donnant une suspension mère 1 + 9 visqueuse ou trop épaisse, d'ajouter davantage de diluant. Dans d'autres cas, pour les résultats d'essai en rapport avec certains critères de spécification, une dilution primaire plus concentrée que 1 + 9 peut être demandée. Il devra être tenu compte de ce facteur dans la suite des opérations et/ou dans l'expression des résultats.

1.2 Dilutions décimales suivantes : Suspensions, émulsions ou solutions obtenues en mélangeant un volume déterminé de la dilution primaire (1.l), avec neuf fois le même volume de diluant approprié et en répétant cette opération sur chaque dilution ainsi préparée jusqu'à obtention d'une gamme de dilutions décimales appropriée pour l'ensemencement des milieux de culture.

2. **Principe**

Préparation de la dilution primaire (suspension mère) (1.1) et, si nécessaire, des dilutions décimales suivantes (1.2) en vue de réduire le nombre de micro-organismes par unité de volume, pour faciliter l'examen microbiologique.

3. **Diluants**

3.1 **Composants de base**

Pour améliorer la fidélité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation du diluant, des composants de base déshydratés ou une préparation complète déshydratée. Les prescriptions techniques doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée avec un appareillage en verre, ou de l'eau déminéralisée. Elle doit être exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des micro-organismes dans les conditions de l'essai. Ceci doit être contrôlé périodiquement en particulier dans le cas de l'eau déminéralisée.

Des solutions d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique (à 0,l mol/ l environ) doivent être utilisées pour ajuster le pH des diluants, sauf spécifications contraires.

3.2 **Diluants pour emploi général**

3.2.1 **Solution peptone - sel**

Composition

Peptone……...……..1,0 g

Chlorure de sodium (NaCI)……...……...……...8,5 g

Eau…….....…1000 ml

Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant, si nécessaire.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation. il soit de 7,0 ± 0,l à 25°C.

3.2.2 **Solution de Ringer diluée au quart**

Composition

Chlorure de sodium (NaCI)……...……..…..…2,25 g

Chlorure de potassium (KCI)…….....….....….0,105 g

Chlorure de calcium anhydre (CaCI2)…....…...0,06 g

Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO3)...…...0,05 g

Eau……..……...….1000 ml

Préparation

Dissoudre les sels dans l'eau.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6,9 ± 0,1 à 25°C.

3.2.3 **Solution de peptone**

Composition

Peptone…….....……..……..….1, 0 g

Eau……..……..……..1000 ml

Préparation

Dissoudre la peptone dans l'eau.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit 7,0 ± 0,1 à 25°C.

3.2.4 **Solution tampon de phosphate**

Composition de la solution mère

Dihydrogénophosphate de potassium

(KH2PO4)……..…….. 42,5 g

Eau……...…….. 1000 ml

Préparation

Dissoudre le sel dans 500 ml d'eau. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,2 ± 0,l à 25 °C, à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique à 1 mol/1.

Diluer à 1000 ml avec de l'eau. Conserver cette solution mère au réfrigérateur.

Avant emploi, ajouter 1 ml de cette solution mère (à 20°C) à 1000 ml d'eau pour l'utiliser en tant que diluant.

3.3 **Diluants pour emplois particuliers**

3.3.1 **Solution de citrate de sodium (pour fromage, fromage fondu et lait sec Hatmaker)**

Composition

Citrate trisodique dihydraté (Na3C6H5O72H20).20,0 g

Eau ……..... 1000 ml

Préparation

Dissoudre le sel dans l'eau en chauffant entre 45 °C et 50°C.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,5 ± 0,l à 25°C.

3.3.2 **Solution de monohydrogéno-phosphate de potassium** (pour le fromage, le fromage fondu, la caséine acide, les poudres de caséine lactique, les caséinates, les poudres de lactosérum acides et les acides et la crème aigre).

Composition

Monohydrogéno-phosphate de potassium

K2HPO4…….....…….…….20,0 g

Eau ……......…….....…….1000 ml

Préparation

Dissoudre le sel dans l'eau en chauffant entre 45 °C et 50°C.

Ajuster le pH. Pour la dilution primaire de la caséine acide, de la caséine lactique et de la poudre de lactosérum acide, le pH après stérilisation doit être de 8,4 ± 0,1 à 25°C. Pour les caséinates, les fromages, les fromages fondus et la crème aigre, il doit être de 7,5 ± 0,1.

3.4 **Répartition, stérilisation et conservation du diluant**

Répartir le diluant (3.2 ou 3.3) dans des fioles (4.4) pour la dilution primaire et dans des tubes à essai (4.5) pour les dilutions décimales (3.2) en quantités telles qu'après stérilisation, chaque fiole (4.4) contienne 9,0 ml (ou d'autres quantités demandées) et chaque tube à essai (4.5) contienne 9,0 ml de diluant ou un multiple de 9,0 ml (ou autres quantités demandées).

Boucher les tubes et les fioles.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C±1 pendant 15 minutes (un temps plus long peut être nécessaire pour des volumes plus importants).

Si le diluant n'est pas utilisé extemporanément le conserver à l'obscurité entre 0 °C et 5 °C, pendant 1 mois au maximum dans des conditions évitant toute modification de son volume ou de sa composition.

Si l'on doit dénombrer plusieurs groupes de micro-organismes en utilisant des milieux de cultures différents, il peut-être nécessaire de répartir tous les diluants (ou quelques-uns) en quantité supérieure à 9,0 ml. La dimension des tubes à essai et des fioles (4.5 et 4.4) doit être prévue en conséquence.

4. **APPAREILLAGE ET VERRERIE**

Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont similaires. La verrerie doit pouvoir résister à des stérilisations répétées et être chimiquement inerte.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, notamment :

4.1 **Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche** (four) ou en chaleur humide (autoclave) (autoclave isolé ou intégré dans un système de préparation et de répartition de milieux).

Le matériel destiné à entrer en contact avec le diluant, l'échantillon pour essai, les dilutions, sauf s'il est livré stérile (appareillage en plastique) doit être stérilisé.

a) soit au four, en le maintenant à une température de 170°C à 175°C pendant au moins 1 heure.

b) soit à l'autoclave, en le maintenant à une température de 121°C ± 1 pendant au moins 20 minutes.

Cependant, les pipettes ne doivent pas être stérilisées à l'autoclave, car l'humidité se condense sur les parois internes lors du refroidissement et affecte la précision du volume délivré.

4.2 **Appareillage pour l'homogénéisation**

Un des appareils suivants doit être utilisé :

a) homogénéisateur rotatif, dont la fréquence de rotation est comprise entre 8000 min-1 et 45000 min-1, avec bols en verre ou en métal, muni de préférence de couvercles, et résistant aux conditions de stérilisation ;

b) homogénéisateur de type péristaltique (stomacher), avec des sacs stériles en matière plastique.

Les bols, les sacs en plastique (type sac stomacher) doivent avoir une capacité suffisante pour permettre de mélanger correctement l'échantillon avec la quantité appropriée de diluant. En général, le volume du récipient doit être égal à environ deux fois le volume de l'échantillon pour l'essai avec le diluant.

4.3 **Agitateur,** capable de mélanger 1 ml ou 2 ml de l'échantillon pour essai (cas des produits liquides) ou des dilutions décimales dans un tube de dimensions suffisantes, avec 9 ml ou 18 ml de diluant, afin d'obtenir une suspension homogène et dont le principe est basé sur un mouvement de rotation excentré du contenu des tubes à essai (par exemple, agitateur Vortex).

4.4 **Fioles,** ayant une capacité suffisante pour contenir en laissant un espace libre suffisant pour permettre l'agitation 90 ml de diluant utilisé pour la suspension mère, ou des multiples de 90 ml.

4.5 **Tubes** à essai, ayant une capacité suffisante pour contenir, en laissant un espace libre suffisant pour permettre l'agitation, 10 ml (ou un multiple de 10 ml, si nécessaire) de l'échantillon pour essai (s'il est liquide) ou de la dilution primaire (autres cas), ou des dilutions décimales suivantes.

4.6 **Pipettes** (bouchées avec du coton), ayant une capacité nominale de 1 ml et une ouverture d'écoulement de 1,75 mm à 3 mm de diamètre.

N'utiliser que des pipettes non ébréchées et, quand cela est nécessaire, avec des graduations bien marquées pour les distinguer nettement du contenu.

4.7 **Pipettes graduées** (bouchées avec du coton), de relativement grande capacité, par exemple de 10 ml ou 20 ml.

4.8 **Billes de verre,** d'environ 6 mm de diamètre.

4.9 **pH-mètre,** à compensation de température, précis à 0,1 unité de pH.

4.10 **Balance,** de portée suffisante et précise à 1 % de la masse nette pesée.

4.11 Bain d'eau, réglable à 45 °C ±1.

4.12 Bain d'eau, réglable à 37 °C ±1.

5. **ECHANTILLONNAGE**

L'échantillonnage se fait dans des conditions appropriées.

6. **MODE OPERATOIRE**

Pour certaines recherches spécifiques (par exemple, Salmonella), des techniques spéciales ou des précautions peuvent être nécessaires. Pour ces cas des techniques particulières sont mentionnées dans la méthode en question.

Les opérations décrites en 6.1.1 et 6.1.2 ne doivent pas être effectuées à la lumière directe du soleil.

Il convient de prendre les précautions normales d'asepsie.

6.1 **Préparation de l'échantillon pour essai et de la dilution primaire**

Pour éviter d'endommager les micro-organismes par de brusques changements de température, la température du diluant, pendant les opérations décrites ci-dessous, doit être du même ordre que celle de l'échantillon pour essai, sauf spécifications contraires.

6.1.1 **Lait et produits laitiers liquides**

Agiter vigoureusement l'échantillon pour essai afin d'assurer une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes, en inversant rapidement 25 fois le récipient contenant l'échantillon. Il faut éviter la formation de mousse ou bien la laisser se disperser. L'intervalle entre le mélange et le prélèvement de la prise d'essai ne doit pas dépasser 3 minutes.

Prélever 1 ml de l'échantillon pour essai à l'aide d'une pipette stérile (4.6) et rajouter à 9 ml de diluant (3.2) (ou 10 ml d'échantillon pour essai à 90 ml de diluant ou 11 ml à 99 ml).

Agiter cette dilution primaire (par exemple, 25 fois avec un mouvement de 300 mm en 7 secondes). On obtient alors la dilution 10-1.

Préparer les dilutions suivantes selon 6.2.

6.1.2 **Lait sec, poudre de lactosérum, babeurre en poudre et lactose**

Mélanger soigneusement le contenu du récipient fermé en le secouant de façon répétée par inversion.

Si l'échantillon pour essai enfermé dans son emballage d'origine est trop plein pour permettre un mélange vigoureux, le transférer dans un récipient plus grand. Mélanger. Ouvrir le récipient, prélever la prise d'essai demandée à l'aide d'une spatule en procédant comme indiqué ci-dessous.

Refermer immédiatement le récipient.

Chauffer au bain d'eau (4.11) une fiole contenant 90 ml d'un diluant adéquat (3.2) ou, si nécessaire, pour la poudre de lait Hatmaker (3.3.1) à un pH 7,5 ± 0,1 à 45°C ± 1.

Peser 10 g de d'échantillon pour essai dans un récipient de verre approprié (par exemple, un bécher) et verser lentement la poudre dans la fiole de dilution contenant le diluant choisi. Sinon, peser 10 g de l'échantillon pour essai directement dans la fiole avec le diluant.

Afin de dissoudre, tourner lentement pour hydrater la poudre, puis agiter 25 fois la fiole pendant environ 10 secondes avec un mouvement d'environ 300 mm. On peut utiliser un homogénéisateur de type péristaltique (4.2 b) comme autre moyen d'agitation.

Replacer la fiole dans le bain d'eau pendant 5 minutes agiter occasionnellement.

Préparer les dilutions suivantes selon 6.2.

Dans le but d'avoir une meilleure reconstitution, en particulier pour la poudre de lait hatmaker, il peut être utile de se servir de billes de verre (4.8). Dans ce cas, il conviendra de les mettre dans les fioles avant stérilisation.

6.1.3 **Fromage et fromage fondu**

Soit peser 10 g de l'échantillon pour essai dans une capsule et les placer dans le récipient de l'homogénéisateur rotatif (4.2 a) ou de l'homogénéisateur de type péristaltique (4.2 b), soit peser directement 10 g d'échantillon pour essai dans le récipient.

Lors de l'utilisation de l'homogénéisateur rotatif ou de l'homogénéisateur de type péristaltique, ajouter 90 ml de diluant (3.2), (3.3.1) ou (3.3.2) à pH 7,5 ± 0,1.

Mélanger jusqu'à ce que le produit soit complètement dispersé (1 minute à 3 minutes). Dans le cas de l'homogénéisateur rotatif, opérer pendant un temps suffisant pour obtenir un total de 15 000 révolutions à 20 000 révolutions.

Même avec l'homogénéisateur rotatif le plus lent, ce temps ne doit pas excéder 2,5 minutes. L' idéal est que la température de dispersion ne dépasse pas 40 °C, et en aucun cas elle ne doit être supérieure à 45 °C. Laisser la mousse se disperser.

Préparer les dilutions suivantes selon 6.2.

6.1.4 **Caséine acide, caséine lactique et poudre acide de lactosérum**

Peser 10 g d'échantillon pour essai dans une capsule.

Les placer dans une fiole de dilution munie de billes de verre (4.8) contenant 90 ml de diluant d'hydrogénophosphate dipotassique (3.3.2) à pH 8,4 ± 0,l pour les caséines acide et lactique.

Laisser pendant 15 minutes à température ambiante, puis élever la température à 37 °C ± 1 au bain d'eau (4.12).

Garder les fioles à 37 °C pendant 15 minutes et secouer vigoureusement par intervalles.

Eviter l'emploi d'un homogénéisateur rotatif (4.2 a) ou d'un homogénéisateur de type péristaltique (4.2 b) à cause de la formation de mousse.

Préparer les dilutions suivantes selon 6.2.

6.1.5 **Caséinates**

Soit peser 10 g d'échantillon pour essai dans une capsule et les placer dans le récipient de l'homogénéisateur rotatif (4.2a) ou de l'homogénéisateur de type péristaltique (4.2b), soit peser 10 g d'échantillon pour essai directement dans le récipient. Ajouter 90 ml de diluant d'hydrogénophosphate dipotassique (3.3.2) à pH 7,5 ± 0,l à température ambiante.

Mélanger pendant environ 2 minutes. Dans le cas de l'homogénéisateur rotatif, opérer pendant un temps suffisant pour obtenir un total de 15000 révolutions à 20000 révolutions. Même avec l'homogénéisateur rotatif le plus lent, ce temps ne doit pas excéder 2,5 minutes.

Elever la température à 37° C ± 1 au bain d'eau (4.12).

Transférer dans une fiole à dilution stérile, dans le cas de l'homogénéisateur rotatif.

Garder à 37° C ± 1 pendant 15 minutes.

Laisser la mousse se disperser avant de poursuivre.

Préparer les dilutions suivantes selon 6.2.

6.1.6 **Beurre**

Peser 10 g d'échantillon pour essai dans un récipient et le placer dans le bain d'eau (4.11) à 45 ° C ± 1. Garder le récipient dans l'eau jusqu'à ce que l'échantillon soit juste fondu.

Ajouter 90 ml de diluant (3.2).

Mélanger. Cette opération est plus facilement réalisée dans l'homogénéisateur de type péristaltique (4.2b).

On peut également travailler uniquement sur la phase aqueuse pour la dilution, comme suit :

Prendre une prise de 50 g contenant environ 8 ml d'eau et ajouter 42 ml de diluant (3.2.3) réchauffé à 45° C.

Placer le récipient dans un bain d' eau (4.11) à 45°C±1 jusqu'à ce que le beurre soit fondu. Bien mélanger et laisser séparer pendant 15 min. au maximum.

Si nécessaire, pour séparer les phases, placer l'échantillon pour l'essai fondu dans un tube à centrifuger stérile (ou faire fondre l'échantillon pour essai directement dans le tube), et centrifuger à une fréquence de rotation de 1000 min-1 à 2000 min-1.

Prélever stérilement la phase grasse (supérieure) avec un tube stérile relié à une pompe à vide. Prélever la couche inférieure.

Préparer les dilutions suivantes selon 6.2.

6.1.7 **Produits laitiers congelés (y compris les glaces de consommation)**

Procéder comme indiqué pour le beurre (6.1.6) (première alternative), mais en utilisant un bain d'eau (4.12) à 37° C ± 1 au maximum.

La température de l'échantillon pour essai ne doit pas dépasser la température de ce bain d'eau.

Préparer les dilutions suivantes selon 6.2.

6.1.8 **Flans, desserts, lait fermeté et crème**

Peser 10g d'échantillon pour essai dans une fiole (4.4) contenant des billes de verre (4.8)

Pour les flans, les desserts et la crême douce ajouter 90 ml de diluant (3.2) et agiter pour disperser.

Pour le lait fermeté et la crème acide utiliser le diluant 3.3.2 à pH 7,5 ± 0,1. On peut utiliser un homogénéisatur de type péristalique (4.2 b).

Préparer les dilutions suivantes selon 6.2.

6.2 **Dilutions décimales suivantes :**

Dans le cas de la recherche de la présence ou de l'absence d'un micro-organisme dans 0,1ml ou 0,1 g de produit, il n'est pas nécessaire de préparer les dilutions décimales.

Introduire avec une nouvelle pipette 1 ml de la dilution primaire (par exemple 6.1.1 ou 6.1.2) dans un nouveau tube contenant 9 ml de diluant stérile (3.2) en évitant le contact de la pipette avec le diluant. Utiliser une nouvelle pipette pour chaque dilution.

Si de plus grands volumes doivent être utilisés, introduire 10 ml de la dilution primaire dans une fiole contenant 90 ml de diluant stérile (3.2) ou 11 ml de la dilution primaire à 99 ml de diluant stérile (3.2).

Dans la pratique courante, quand on exige une dilution 10^{-3}, 1 ml de la dilution primaire devrait être rajouté à 99 ml de diluant stérile (3.2).

Mélanger soigneusement, soit par aspiration refoulement, 10 fois, avec une nouvelle pipette, soit en utilisant un agitateur mécanique (4.3) pendant 5 à 10 secondes pour obtenir la dilution 10^{-2}.

La vitesse de rotation doit être choisie de sorte que le liquide tournoyant affleure à 2 à 3 cm du bord du récépient.

Si nécessaire, répéter ces opérations avec le diluant stérile (3.2) en utilsant la dilution 10^{-2} et les suivantes pour obtenir les dilutions 10^{-3}, 10^{-4}, etc... jusqu'à obtention du nombre approprié de micro-organismes par millilitre (voir 2).

Lorsque 10 ml plus 90 ml ou 11 ml plus 90 ml ont été prélevés, ajouter manuellement comme indiqué en 6.1.1.

6.3 **Durée des opérations**

Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la dilution primaire et le mélange des dilutions et des milieux (décrit selon les méthodes spécifiques) ne doit pas être supérieur à 15 minutes.

★

Arrêté du 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004 rendant obligatoire une méthode de contrôle microbiologique pour le lait pasteurisé.

Le ministre du commerce,

Vu le décret exécutif n °90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n °02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 29 Safar 1414 correspondant au 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. – En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n ° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de contrôle microbiologique pour le lait pasteurisé.

Art. 2 — Pour le contrôle microbiologique du lait pasteurisé, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004.

Noureddine BOUKROUH

ANNEXE

METHODE DE CONTROLE MICROBIOLOGIQUE POUR LE LAIT PASTEURISE

1. Préparation de l'échantillon pour essai

Il est nécessaire de rendre l'échantillon homogène avant chaque analyse, par exemple, agiter soigneusement en inversant rapidement 25 fois le préemballage, ou appliquer des techniques appropriées donnant des résultats identiques.

Ouvrir aseptiquement le préemballage après avoir nettoyé à l'éthanol la surface d'ouverture.

Procéder à l'analyse bactériologique dans un délai n'excédant pas trois minutes.

Jusqu'au moment de l'analyse, conserver l'échantillon à 6° C.

2. Dilutions décimales

La préparation des dilutions décimales est effectuée avec le diluant suivant.

2.1 Composition

Peptone pancréatique de caséine (tryptone).....……1 g

Chlorure de sodium.....…...8,5 g

Eau distillée.....…..1000 ml

2.2 Préparation

Faire dissoudre les composants dans l'eau en chauffant légèrement. Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7 ± 0,l à 25° C.

Répartir, par exemple, à raison de 100 ml dans des flacons de capacité appropriée.

Stériliser à l'autoclave à 121 ° C ± 1 pendant vingt minutes.

2.3 Préparation des dilutions décimales

Au moment de l'emploi, distribuer aseptiquement le diluant à raison de 9 ml dans des tubes stériles de 20 x 200 mm. Pour la préparation des dilutions, utiliser le diluant à température ambiante.

Une dilution au 1/10 est obtenue en transférant aseptiquement 1 ml de lait à l'aide d'une pipette de 1 ml stérile dans 9 ml de diluant (2.1.). Une dilution au 1/100 est obtenue en transférant 1 ml de la dilution au 1/10 à l'aide d'une nouvelle pipette de 1 ml stérile dans un second tube de diluant.

Procéder de manière identique pour les dilutions suivantes.

Mélanger soigneusement chacune des dilutions pendant 5 à 10 secondes au moyen d'un agitateur mécanique à mouvement de rotation excentré au moment de leur préparation et avant les ensemencements.

3. Dénombrement des micro-organismes aérobies à 30° C.

Gélose pour dénombrement

3.1 Composition

Peptone pancréatique de caséine (tryptone).….....5,0 g

Extrait de levure déshydratée.....….....……...2,5 g

Glucose anhydre.....….....…….....1,0 g

Lait écrémé en poudre(exempt de substances inhibitrices).....10 g

Ou lait écrémé (exempt de substances inhibitrices) 10 ml

Agar-agar.....……..….....12 à 18 g

Eau distillée.....…….....1000 ml

3.2 Préparation

Faire dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau en portant à ébullition. Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7 ± 0,l à 25° C.

Répartir à raison de 100 ml dans des flacons de capacité appropriée ou de 12 à 15 ml dans des tubes de 18 x 180 mm ou 20 x 200 mm.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C ± 1 pendant 20 minutes. Le milieu peut être conservé trois mois au maximum et à l'obscurité entre 0°C et 5°C.

3.3 Mode opératoire

Transférer en double 1 ml des dilutions retenues (2.3) dans des boîtes de Pétri stériles de 90 ou 100 mm de diamètre. Couler 12 à 15 ml de milieu, fondu au préalable et refroidi dans un bain d'eau à 45 °C ± 0,5 (le maintien dans le bain d'eau ne doit pas excéder trois heures). Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu.

Laisser solidifier en posant les boîtes sur une surface fraîche et horizontale.

Placer les boîtes de Pétri retournées dans une étuve à 30°C ± 1 pendant 72h ± 2 h..

Le délai entre la préparation des dilutions et l'introduction de la gélose dans les boîtes ne doit pas excéder 15 minutes.

3.4 Expression des résultats

Retenir pour comptage, les boîtes de Pétri contenant un nombre de colonies compris entre 10 et 300. Utiliser, si nécessaire, une loupe d'un grossissement de 1,5 au maximum.

3.5 Mode de calcul

Calculer le nombre de micro-organismes par millilitre de lait à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Nombre/ml} = \frac{\text{Nombre total de colonies comptées}}{\text{Volume ensemencé de l'échantillon}}$$

ou

$$\frac{\sum c}{(n1 + 0{,}1\ n2)\ d}$$

où :

c : Somme totale des colonies comptées.

nl : Nombre de boîtes comptées dans la première dilution.

n2 : Nombre de boîtes comptées dans la seconde dilution.

d : Facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus.

Exemple : Dilution 10-2 278 et 290 colonies.
Dilution 10-3 33 et 28 colonies.

$$\text{Nombre/ml} : \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 0{,}1 \times 2)\ 10\text{-}2} = \frac{629}{0{,}022} = 28590$$

Pour exprimer le nombre de microorganismes, arrondir le nombre à deux chiffres significatifs.

Quand le chiffre qui doit être arrondi est 5, arrondir de manière que la valeur indiquée immédiatement à gauche soit paire.

Dans l'exemple, le résultat devra être arrondi à 29 000 ou

$2{,}9 \times 10^4$ si les boîtes contiennent moins de 10 colonies donner le nombre de micro-organismes par millilitre sous la forme moins de 10 x d, « d » étant l'inverse du facteur de dilution le plus faible.

Si les boîtes contiennent plus de 300 colonies, faire une estimation à partir des boîtes ayant un comptage proche de 300 colonies. Donner le résultat avec l'indication « nombre estimé de micro-organismes par millilitre ».

Le résultat peut-être exprimé par un nombre compris entre 1 et 9,9 multiplié par 10x, « x » étant la puissance de 10 appropriée.

L'expérience montre que si le résultat le plus élevé de deux essais indépendants sur le même échantillon dépasse fréquemment le résultat le plus bas de 30 %, l'analyste doit exprimer son mode opératoire afin de déterminer les sources d'erreurs.

4. **Dénombrement des coliformes à 30 ° C et des coliformes fécaux.**

Utiliser la gélose lactosée à 0,5 ‰ de désoxycholate de sodium

4. 1 **Composition**

Peptone.....10 g

Lactose.....10 g

Désoxycholate de sodium.....0,5 g

Chlorure de sodium.....5 g

Citrate de sodium.....2 g

Agar agar .....12 à 15 g

Rouge neutre.....0,03 g

Eau distillée .....1000 ml

4.2 **Préparation**

La préparation est extemporanée. Préparer la quantité nécessaire ne pas stériliser à l'autoclave.

Faire dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau en portant à ébullition. Refroidir le milieu en le maintenant dans un bain d'eau à 45 ± 0,5° C.

Eviter de surchauffer le milieu : un chauffage prolongé ou des chauffages répétés diminuent son pouvoir sélectif et nuisent à la spécificité de l'épreuve.

4.3 **Mode opératoire**

Transférer en double 1 ml de lait et 1 ml d'une dilution au 1/10 (2.3) dans les boîtes de Pétri stériles de 90 ou 100 mm de diamètre.

Couler 12 ml de gélose au désoxycholate et mélanger linoculum avec le milieu. Laisser solidifier en posant les boîtes sur une surface fraîche et horizontale. Lorsque le milieu est solidifié, couler environ 4 ml de milieu non ensemencé. Laisser solidifier à nouveau.

4.3.1 **Coliformes à 30° C**

Placer les boîtes de Pétri retournées dans une étuve à 30°C ±1°C pendant 24 heures ± 2 h.

4.3.2 **Coliformes fécaux**

Placer les boîtes de Pétri retournées dans une étuve à 44° C ± 1° C pendant 24 heures ± 2 h.

4.4 **Expression des résultats**

4.4.1 **Sélection des boîtes**

Retenir pour comptage, les boîtes de Pétri contenant moins de 150 colonies caractéristiques rouge foncé d'un diamètre d'au moins 0,5 mm.

4.4.2 **Mode de calcul**

Donner le résultat des coliformes par millilitre de lait après avoir effectué la moyenne arithmétique des colonies comptées sur boîtes ensemencées par le même volume de l'échantillon. Le résultat peut être obtenu également à partir de la moyenne arithmétique entre les valeurs obtenues par l'examen de 1 ml de lait et dilution décimale, sauf lorsque le rapport de la valeur la plus faible est supérieur à 2; dans ce cas, retenir comme résultat la valeur la plus faible.

Si les valeurs sont obtenues depuis une dilution décimale, multiplier par l'inverse du facteur de dilution.

Le résultat peut être exprimé par un nombre compris entre 1 et 9,9 multiplié par10x «x» étant la puissance de 10 appropriée.

5. **Dénombrement de staphylococcus**

Utiliser la gélose BAIRD PARKER.

5.1 **Composition**

Peptone pancréatique de caséine (tryptone)….....10 g
Extrait de levure.....…1 g
Extrait de viande.....…5 g
Glycine .....….12 g
Chlorure de lithium.....…5 g
Agar-agar .....….....…12 à 20 g
Eau.....…..1000 ml

Faire dissoudre les composants dans de l'eau en portant à ébullition. Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,2 ± 0,l à 25° C.

Répartir le milieu à raison de 90 ml dans des flacons de capacité appropriée.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C ± 1 pendant 15 minutes. Le milieu de base peut être conservé un mois entre 0 et + 5° C.

5.2 **Milieu complet et préparation des boîtes**

Au moment de l'emploi, après fusion du milieu de base (5.1) faire refroidir dans un bain d'eau à 50 ° C et ajouter à 90 ml :

Solution aqueuse à 1 % de tellurite de potassium : 1 ml ;

Solution aqueuse à 20 % de pyruvate de sodium : 5 ml ;

Emulsion de jaune d'œuf, concentration à environ 20 % : 5 ml.

Mélanger soigneusement entre chaque addition et couler le milieu à raison de 28 ± 1 ml dans des boites de Pétri de 140 mm de diamètre ou de 15 ml ou 20 ml dans des boîtes de Pétri de 90 mm ou 100 mm de diamètre respectivement.

Laisser solidifier, puis sécher les boîtes en les plaçant retournées couvercles largement ouverts, dans une étuve entre 45° C et 53° C durant 30 minutes.

Procéder aux ensemencements dans les 30 minutes qui suivent la fin du séchage.

Les boîtes contenant la gélose Baird Parker non séchées peuvent être utilisées pendant 24 heures entre 0°C et +5° C.

Si l'on suspecte la présence de Proteus, il est conseillé d'ajouter une solution de sulfamézathine.

Sulfamézathine.....……..…….0,2 g
Solution d'hydroxyde de sodium 0,l mol/1….....10 ml
Eau Q.S.P.....……..…..100 ml

Dissoudre la sulfamézathine dans la solution d'hydroxyde de sodium, compléter à 100 ml avec de l'eau.

Stériliser cette solution par filtration sur membrane.

Au moment de l'emploi, après fusion de la gélose, ajouter 27,5 ml de cette solution à 100 ml de milieu de base.

5.3 **Mode opératoire**

5.3.1 **Ensemencement**

Selon le format des boîtes de Pétri, l'ensemencement de 1 ml de lait sera pratiqué de la manière suivante :

Boîtes de 140 mm : à l'aide d'un étaleur en verre stérile, étaler à la surface du milieu la totalité du volume.

Boîtes de 90 ou 100 mm : distribuer 1 ml à la surface du milieu de trois boîtes de Pétri sous forme de trois fractions sensiblement égales, puis étaler en utilisant le même étaleur pour les trois boites.

Attendre 15 minutes avant de placer les boîtes de Pétri retournées dans une étuve à 37 ° ± 1° C pendant 24 à 48 heures.

5.3.2 **Sélection des boîtes et choix des colonies**

Après 24 et 48 heures d'incubation, marquer sur le fond des boîtes les colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques.

Colonies caractéristiques : Colonies noires, brillantes, convexes, entourées d'une zone transparente qui peut être translucide. Après 24 heures, peut apparaître dans cette zone transparente un anneau opalescent immédiatement au contact des colonies.

Colonies non caractéristiques : Colonies noires, brillantes convexes ou gris noirâtre ayant parfois un aspect mat et une texture sèche, dépourvues de zone transparente (exceptées certaines colonies gris noirâtre).

Retenir pour comptage, les boîtes contenant moins de 250 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques par boîte de 140 mm; 150 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques par boite de 90 ou 100 mm.

Prélever en vue de l'épreuve de la coagulase un nombre maximum de cinq colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques en tenant compte de leur nombre respectif.

De manière identique, dix colonies au maximum seront prélevées dans le cas d'un volume réparti en trois fractions ou en double.

5.3.3 **Epreuve de la coagulase**

Ensemencer la colonie dans un bouillon cœur et incuber dans une étuve à 37° C durant 20 à 24 heures.

Pour l'épreuve de la coagulase, utiliser un plasma de lapin contenant de l'E.D.T.A. (acide éthylène diamine tétra-acétique), à défaut ajouter une solution d'E.D.T.A. de sorte que la concentration finale dans le plasma réhydraté soit de 0,l %.

L'épreuve est reconnue positive lorsque le coagulum occupe plus des trois quarts du volume initial.

5.4 **Expression des résultats**

Si au moins 80 % des colonies examinées sont coagulase positive, considérer que la totalité des colonies dénombrées correspond à Staphylococcus aureus , sinon, exprimer le résultat global en tenant compte des proportions (colonies caractéristiques et colonies non caractéristiques).

Le résultat peut être exprimé par un nombre compris entre 9,9 multiplié par 10 x, « x » étant la puissance de 10 appropriée.

6. **Recherche des Salmonella**

6.1 **Utiliser les milieux complets déshydratés correspondant aux indications données ci-dessous.**

6.2 **Mode opératoire**

6.2.1 **Préenrichissement**

Afin de réduire la charge de travail, prélever aseptiquement de chacune des cinq unités, 250 ml de lait et les rassembler dans un récipient stérile de 1,5 à 2 litres.

Abandonner à la température ambiante pendant 1 heure, si nécessaire, ajuster le pH à 6,8 environ. Introduire aseptiquement 2,25ml d'une solution aqueuse à 1 % de vert brillant. Mélanger soigneusement.

Incuber à l'étuve à 37° C pendant 20h ± 2 heures.

6.2.2 **Enrichissement**

Introduire 10 ml de lait préenrichi dans 100 ml de bouillon Muller Kauffmann au tétrathionate et au vert brillant ; faire incuber dans un bain d'eau à 43 °C± 1 pendant quarante-huit heures. Et dans 100 ml de bouillon au sélénite-cystine, faire incuber à l'étuve à 37 °C ± 1 pendant quarante-huit heures.

6.2.3 **Isolement**

Après l'incubation, pratiquer à partir de chaque bouillon des isolements. Effectuer les isolements à la surface de deux milieux sélectifs solides coulés de préférence dans des boîtes de Pétri de 140 mm.

Utiliser la gélose au vert brillant et au rouge de phénol, et la gélose au sulfate de bismuth.

En raison de l'existence possible de Salmonella atypiques, lactose +, on peut substituer la gélose au vert brillant et au rouge de phénol par un autre milieu sélectif, par exemple : la gélose XLD, la gélose Hektoen.

Retourner les boîtes à l'étuve à 37° C pendant dix huit à vingt heures. Si le développement est insuffisant, poursuivre l'incubation.

Soumettre aux épreuves biochimiques classiques un nombre suffisant de colonies caractéristiques ou douteuses.

———★———

Arrêté du 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrement des coliformes pour les crèmes glacées et les glaces au lait.

Le ministre du commerce,

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 29 Safar 1414 correspondant au 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de dénombrement des coliformes pour les crèmes glacées et les glaces au lait.

Art. 2. — Pour le dénombrement des coliformes dans les crèmes glacéés et les glaces au lait , les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004.

Noureddine BOUKROUH.

———————

ANNEXE

METHODE DE DENOMBREMENT DES COLIFORMES DANS LES CREMES GLACEES ET LES GLACES AU LAIT

1. **DEFINITION**

On appelle "coliformes", les bactéries en forme de bâtonnets, Gram négatives, aérobies et facultativement anaérobies, non sporulées, qui fermentent le lactose avec formation de gaz et d'acide.

2. **PRINCIPE DE LA METHODE**

2.1 **Méthode de référence**

Trois séries de dilutions en parallèle obtenues à partir de l'échantillon du produit servant à ensemencer le milieu liquide sélectif «Vert Brillant lactosé à la bile de bœuf» dans des tubes à essai contenant de petits tubes de Durham. On incube les tubes pendant 48 heures + 2 h à 30°C ± 1.

Les tubes positifs (production de gaz dans les tubes de Durham) seront soumis à confirmation par repiquage d'une ose dans un nouveau tube du même milieu. A partir des tubes pour lesquels le test est positif, après confirmation, on détermine le nombre le plus probable de bactéries coliformes par g du produit en se référant au tableau du nombre le plus probable (NPP) pour trois séries parallèles.

2.2 **Méthode de routine**

On ensemence le milieu solide « Rouge Violet Bile Agar » coulé en boîtes de Pétri, avec une série de dilutions de l'échantillon du produit. Après une incubation de 22h ± 2 h. à 30 °C ± 1, on compte le nombre de colonies rouges caractéristiques. Ce nombre, après avoir été multiplié par le facteur de dilution, exprime le nombre de bactéries coliformes par g du produit.

(La méthode au vert brillant figurant au paragraphe 2.1 peut également, après modification, être utilisée en tant que méthode de routine. Dans ce cas, on omettra l'ensemencement en séries parallèles nécessaires à l'utilisation du tableau du NPP et la confirmation des tubes positifs).

3. **ECHANTILLONNAGE**

3.1 **Echantillonnage de laboratoire**

3.1.1 Dans le cas des crèmes glacées ou glaces au lait se présentant sous la forme de petits emballages, on prélèvera des unités complètes dans leur emballage d'origine.

3.1.2 Dans le cas de crèmes glacées et de glaces au lait en vrac (pour la vente dans les tea-rooms, dans les restaurants, ou par distributeurs automatiques pour self service, etc.) ; et en grands emballages, on prélèvera, en s'entourant de précautions aseptiques, 30 à 50 grammes du produit au total en procédant par sondage à des endroits aussi variés que possible. Ces échantillons seront conservés à -5 ° C dans des flacons à large col, munis de couvercle à vis.

3.1.3 Les échantillons (3.1.1 et 3.1.2) devront être maintenus congelés avant l'analyse. Ils seront transportés au laboratoire pour analyse, dans des récipients réfrigérés. L'analyse devra de préférence être effectuée immédiatement.

Dans le cas contraire, conserver les échantillons dans une enceinte réfrigérée à -15° C maximum.

3.2 **Préparation des échantillons**

3.21 Avant ensemensement du milieu, les échantillons seront liquifiés de la façon suivante :

Dans le cas des échantillons prélevés selon 3.11 : ôter l'emballage et disposer les échantillons dans un récipient stérile en verre que l'on refermera.

Dans le cas des échantillons prélevés selon 3.12 : les maintenir dans les flacons.

Ces deux types d'échantillons seront liquéfiés, dans les récipients ou les flacons, en les plaçant, juste le temps nécessaire à leur fusion, au bain-marie ou dans un incubateur, à 45°C ± 1.

3.2.2 Mélanger intimement les échantillons liquéfiés et prélever, en s'entourant de précautions aseptiques, 10 grammes (ou un poids voisin exactement connu) dans un flacon cylindre - conique contenant des perles de verre. On pourra se servir à cet effet d'une cuillère ou d'une pipette, en fonction de la consistance du produit.

3.2.3 A ces 10 g (ou à un poids voisin de ces 10 g) ajouter dans le flacon contenant des perles de verre, 90 ml (ou 9 fois le poids voisin de 10 g exactement connu), d'une solution de Ringer au quart préalablement chauffée à 45 ° C. Après avoir bouché le flacon, agiter le contenu vingt fois par des mouvements d'une amplitude de 30 cm environ.

4. **APPAREILLAGE ET VERRERIE**

Matériel courant de laboratoire.

5. **MILIEUX DE CULTURE**

5.1 La composition du milieu «Vert Brillant lactosé à la bile de bœuf » est la suivante :

Peptone.....10 g
Lactose .....10 g
Bile de bœuf déshydratée.....20 g
Vert brillant.....0,0133 g
Eau distillée (dans un appareil en verre).....1000 ml

5.2 Pour préparer 1000 ml du milieu, dissoudre peptone et lactose dans environ 500 ml d'eau distillée. Dissoudre 20 g de bile de bœuf anhydre dans 200 ml d'eau distillée. Le pH de cette solution doit être compris entre 7,0 et 7,5. Mélanger les deux solutions; ajuster le pH, mesuré à l'aide d'une électrode en verre à 7,4; ajouter 13,3 ml d'une solution aqueuse à 0,l% de vert brillant. Le volume est à compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée.

5.3 Verser 10 ml du milieu (5.2) dans les tubes à essai. Ces tubes sont munis de tubes de Durham. Après le remplissage, stériliser pendant 15 minutes dans des autoclaves réglés à 121 ° C. Après stérilisation, le pH doit être de 7,2 ± 0,1.

Pour les ensemencements de 10 g, les constituants du milieu doivent être augmentés de 100% et les tubes à essai munis de tubes Durham doivent recevoir 10 ml du milieu.

5.4 La composition du milieu « Rouge Violet Bile Agar » suivante :

Extrait de levure.....3 g
Peptone .....7 g
Sels biliaires.....1,5 g
Lactose .....10 g
Chlorure de sodium.....5 g
Rouge neutre.....0,03 g
Cristal violet.....0,002 g
Gélose.....10 à 15 g
(en fonction des propriétés gélifiantes de la gélose utilisée).

5.5 Dissoudre les ingrédients dans de l'eau distillée ; laisser reposer pendant quelques minutes ; mélanger ensuite énergiquement et ajuster le pH à 7,4 en le mesurant à l'aide d'une électrode de verre. Porter à ébullition en agitant de temps en temps; laisser bouillir pendant deux minutes. Refroidir le milieu à 45 °C environ et en couler 10 ml par boîte de Pétri.

5.6 Le milieu doit être préparé peu avant l'utilisation et ne doit pas être stérilisé à l'autoclave, ce qui atténuerait sa sélectivité. Le milieu doit être employé, si possible, dans les trois heures suivant sa préparation.

5.7 Il est recommandé d'utiliser pour ces milieux (5.1 et 5.4) une préparation anhydre prête à l'emploi. Dans ce cas, les prescriptions techniques doivent être suivies scrupuleusement et on préparera toujours un témoin.

6. **DILUANT**

Solution de Ringer au quart. La composition de la solution concentrée est la suivante :

Chlorure de sodium (NaCI).....9,00 g

Chlorure de potassium (KCI).....0,42 g

Chlorure de calcium anhydre (CaCI2).....0,24 g

Bicarbonate de sodium (NaHCO3).....0,20 g

Eau distillée (dans un appareil en verre).....1000 ml

Pour l'emploi, ajouter une partie de la solution précédente, à trois parties d'eau distillée. La solution diluée est stérilisée par chauffage pendant 15 minutes à 120° C.

On peut également employer une solution de peptone à 0,1% en lieu et place de la solution de Ringer diluée au quart.

On peut également utiliser des pastilles prêtes à l'emploi représentant une dose toute préparée.

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique.

7. **MODE OPERATOIRE**

7.1 Préparation des dilutions

7.1.1 Pour l'ensemencement direct du milieu nutritif

Cas de la méthode de référence (2.1) : on introduit 1 ml de l'échantillon dans chacun des trois tubes contenant 10 ml de vert brillant lactosé à la bile de bœuf et un tube de Durham, et on mélange soigneusement cette portion de l'échantillon avec le milieu nutritif en évitant toutefois la formation de bulles d'air dans le tube de Durham.

Cas de la méthode de routine (2.2) : on procède de la même façon que ci-dessus mais on n'ajoute 1 ml de l'échantillon qu'à un seul tube (au lieu de trois). Si on utilise le milieu « Rouge violet Bile Agar », on introduit directement 1 ml de l'échantillon dans une boîte de Pétri.

7.1.2 On procédera comme suit pour les autres dilutions

Inoculer 1 ml du mélange (3.2.3) directement dans le milieu nutritif ou dans les boîtes de Pétri. On obtient ainsi la dilution 10-1.

10 ml du mélange (3.2.3) sont ajoutés à 90 ml d'une solution de Ringer au quart et on inocule 1 ml de ce mélange dans les milieux nutritifs ou dans les boîtes de Pétri. On obtient ainsi la dilution 10-3. On poursuivra de la même façon pour les autres dilutions.

7.2 **Ensemencement du milieu**

7.2.1 Ensemencement des tubes avec le «Vert Brillant lactosé à la bile de bœuf» :

Ensemencer les tubes avec la quantité désirée de l'échantillon et les dilutions correspondantes à l'aide d'une pipette stérile. Mélanger soigneusement, en évitant d'introduire des bulles d'air dans les tubes de Durham;

Ensemencer en parallèle dans trois tubes chaque quantité d'échantillon et chaque dilution et opérer au moins sur trois dilutions par exemple 1g ; 0,l g et 0,01 g.

En général, on doit prévoir un nombre de dilutions suffisant pour que les trois tubes parallèles de la dilution la plus élevée demeurent négatifs. Ce n'est que par ce moyen que les résultats les plus exacts peuvent être obtenus.

7.2.2 Ensemencement des boîtes de Pétri

Introduire dans les boîtes 1 ml de l'échantillon, et 1 ml des autres dilutions désirées;

Dans chaque boîte, verser 10 ml du milieu « Rouge Violet Bile Agar » fondu, amené à une température de 45° C.

Immédiatement après avoir versé le milieu, le mélanger à l'inoculum par cinq mouvements de va-et-vient, suivis de cinq mouvements circulaires dans le sens des aiguilles d'une montre, puis de cinq mouvements de va-et-vient exécutés perpendiculairement aux premiers, et enfin de cinq mouvements circulaires en sens contraire des aiguilles d'une montre. Après gélification, recouvrir la surface de la boîte de 4 ml de milieu encore liquide et laisser gélifier.

7.3 **Incubation des tubes et des boîtes de Pétri**

7.3.1 **Les tubes** (par. 7.2) seront incubés pendant 48 h. ± 2 h à 30°C ± 1.

7.3.2 **Les boîtes de Pétri** préparées comme décrit au paragraphe 7.2.2 ci-dessus sont incubées pendant 22 h. ± 2 h. à 30°C ± 1.

La durée d'incubation doit être respectée scrupuleusement.

7.4 **Dénombrement des bactéries coliformes**

7.4.1 Cas de la méthode de référence (2.1)

Le test est considéré comme positif lorsqu'il y a production visible de gaz dans les tubes de Durham. Le nombre de tubes positifs confirmés (2.1) est déterminant pour la lecture du nombre le plus probable (NPP) de bactéries coliformes selon le tableau ci-dessous, pour trois séries parallèles.

Le NPP détermine le nombre de bactéries coliformes dans le volume de crème glacée ou de glace au lait, en règle générale 1g ou 0,l g ou 0,01 g avec lequel on a ensemencé en parallèle les 3 premiers tubes à partir desquels on constitue l'index.

Le nombre de bactéries coliformes sera exprimé par le nombre le plus probable (NPP) par 1 g de crème glacée ou glace au lait.

Si tous les tubes sont positifs, il faut répéter l'analyse en utilisant des dilutions plus élevées (par exemple 0,l g - 0,01 ou 0,001 g ou encore plus élevées). Si l'on trouve un chiffre index ne figurant pas dans le tableau, on peut conclure qu'une erreur a été commise dans les manipulations.

7.4.2 Cas de la méthode de routine (2.2)

7.4.2.1 **Après la durée** d'incubation prescrite ci-dessus, compter à l'œil nu, les colonies rouges caractéristiques des bactéries coliformes;

7.4.2.2 **Au cas où la méthode simplifiée** (par 2.2) faisant appel au Vert Brillant lactosé à la bile de bœuf, est utilisée, il faudra déterminer jusqu'à quelle dilution on peut déceler une formation de gaz dans les tubes de Durham. Une formation positive de gaz indique dans quelle portion de l'échantillon on peut trouver des coliformes.

Les résultats feront donc état de la détection de bactéries coliformes dans 1 g ou 0,l g ou 0,01 g etc.

8. **EXPRESSION DES RESULTATS**

8.1 **Méthode de référence (2.1)**

Nombre le plus probable par g selon le tableau ci-dessous.

8.2 **Méthode de routine (2.2)**

8.2.1 Nombre de colonies par g = nombre de colonies défini sous 7.4.2.1 multiplié par l'inverse de la dilution.

8.2.2 Si l'on utilise la méthode simplifiée (2.2) indiquer le nombre de coliformes positifs dans 1g, 0,lg ou 0,01 g etc.

9. **REPETABILITE**

9.1 **Méthode de référence (2.1)**

La différence entre les résultats de déterminations effectuées en double (résultats obtenus simultanément ou rapidement l'un après l'autre par le même analyste) ne doit pas s 'écarter de plus de 30 % du résultat le plus bas.

9.2 **Méthode de routine (3.2)**

Une seule détermination suffit.

Tableau : NOMBRE LE PLUS PROBABLE (NPP) POUR TROIS SERIES PARALLELES

INDEX TUBES POSITIFS DE :			NPP (pour 1 g)	INDEX TUBES POSITIFS DE :			NPP (pour 1 g)
1 g	0,1 g	0,01 g		1 g	0,1 g	0,01 g	
0	0	0	0	2	2	3	4,0
0	0	1	0,3	2	3	0	3,0
0	1	0	0,3	2	3	1	3,5
0	1	1	0,6	2	3	2	4,0
0	2	0	0,6	3	0	0	2,5
1	0	0	0,4	3	0	1	4,0
1	0	1	0,7	3	0	2	6,5
1	0	3	1,1	3	1	0	4,5
1	1	0	0,7	3	1	1	7,5
1	1	1	1,1	3	1	2	11,5
1	2	0	1,1	3	1	3	16,0
1	2	1	1,5	3	2	0	9,5
1	3	0	1,6	3	2	1	15,0
2	0	0	0,9	3	2	2	20,0
2	0	1	1,4	3	2	3	30,0
2	0	2	2,0	3	3	0	25,0
2	1	0	1,5	3	3	1	45,0
2	1	1	2,0	3	3	2	110,0
2	1	2	3,0				
2	2	0	2,0				
2	2	1	3,0				
2	2	2	3,5				

ARRETES, DECISIONS ET AVIS

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 13 Dhou El Hidja 1425 correspondant au 23 janvier 2005 rendant obligatoire une méthode de recherche des salmonella dans le lait et les produits laitiers.

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 04-138 du 6 Rabie El Aouel 1425 correspondant au 26 avril 2004 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n ° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n ° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n ° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de recherche des salmonella dans le lait et les produits laitiers.

Art. 2. — Pour la recherche des salmonella dans le lait et les produits laitiers, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode d'analyse microbiologique décrite en annexe. Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 13 Dhou El Hidja 1425 correspondant au 23 janvier 2005.

Noureddine BOUKROUH

ANNEXE

METHODE DE RECHERCHE DES SALMONELLA DANS LE LAIT ET LES PRODUITS LAITIERS

1. **DEFINITIONS :**

Dans le cadre de la présente méthode, les définitions suivantes sont applicables.

1.1 **SALMONELLA**

Micro-organisme formant des colonies typiques sur des milieux sélectifs solides et possédant des caractéristiques biochimiques et sérologiques décrites lorsque les essais sont effectués conformément à la présente méthode.

1.2 **RECHERCHE DES SALMONELLA**

Détermination de la présence ou de l'absence de ces micro-organismes dans une masse ou un volume déterminé de produit, lorsque l'essai est exécuté selon la présente méthode.

2. **PRINCIPE :**

En général, la recherche des salmonella nécessite 4 phases successives telles qu'indiquées de 2.1 à 2.4

(Voir également le schéma du mode opératoire dans l'annexe).

2.1 **PRE-ENRICHISSEMENT DANS UN MILIEU LIQUIDE**

Ensemencement de la prise d'essai dans le milieu de pré-enrichissement approprié, puis incubation à 37 ° C durant 16h à 20h.

2.2 **ENRICHISSEMENT DANS DES MILIEUX LIQUIDES SELECTIFS**

— Ensemencement d'un milieu au tétrathionate et d'un milieu sélénite-cystine avec la culture obtenue (2.1)

— Incubation du milieu au tétrathionate à 43 °C et incubation du milieu sélénite cystine à 37 °C durant 2 périodes de 18h à 24h.

2.3 **ISOLEMENT ET IDENTIFICATION**

A partir des cultures obtenues (2.2), ensemencement des 2 milieux sélectifs solides gélose au rouge de phénol et au vert brillant et gélose au sulfite de bismuth.

Incubation à 37 ° C et examen après 20h à 24h, et si nécessaire, après 40h à 48h, pour contrôler s'il y a présence de colonies, présumées être des salmonella en raison de leurs caractéristiques.

2.4 **CONFIRMATION**

Repiquage des colonies présumées de Salmonella (2.3) et confirmation au moyen des essais biochimiques et sérologiques appropriés.

3. **MILIEUX DE CULTURE, REACTIFS ET SERUMS**

3.1 **COMPOSANTS DE BASE**

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation des milieux de culture, des composants de base déshydratés ou des milieux complets déshydratés.

Les produits chimiques utilisés pour la préparation des milieux de culture et des réactifs doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou déminéralisée, et être exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des micro-organismes dans les conditions de l'essai.

Lorsque la gélose est spécifiée, la quantité utilisée doit varier conformément aux prescriptions indiquées pour donner des milieux d'une fermeté appropriée.

Les mesurages de pH doivent être effectués à l'aide d'un pH-mètre, ces mesurages se référant à une température de 25°C. Les ajustements éventuels sont faits par addition, soit d'une solution d'acide chlorhydrique à 1 mol/l, soit d'une solution d'hydroxyde de sodium à 1 mol/l.

Les milieux de culture préparés et les réactifs ne sont pas utilisés extemporanément, ils doivent, sauf spécifications contraires, être conservés à l'obscurité, à une température de 4 ± 1°C pendant 1 mois au maximum, dans des conditions qui évitent toute modification de leur composition.

3.2 **MILIEUX DE CULTURE**

3.2.1 **MILIEU DE PRE-ENRICHISSEMENT**

EAU PEPTONEE TAMPONNEE.

COMPOSITION :

Peptone ..... 10,0 g
Chlorure de sodium ..... 5,0 g
Hydrogéno-orthophosphate disodique
Dodécahydraté (Na_2HP0_4, $12H_20$)..... 9,0 g
Dihydrogéno-orthophosphate de potassium
(KH_2PO_4)..... 1,5 g
Eau..... 1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre les composants dans l'eau en portant à ébullition.

— Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 ± 0,1.

— Répartir le milieu, par quantités de 225 ml, dans des flacons de 500 ml de capacité (ou des multiples de 225 ml dans des flacons de capacité adéquate).

— Stériliser le milieu durant 15 min. à 121 ± 1° C.

3.2.2 **MILIEU D'ENRICHISSEMENT SELECTIF**

Bouillon au tétrathionate (Muller - Kauffmann)
Vert brillant ..... 0,5 g
Eau ..... 100 ml

3.2.2.1 **MILIEU DE BASE**

COMPOSITION :

Extrait de viande ..... 5,0 g
Peptone ..... 10,0 g
Chlorure de sodium ..... 3,0 g
Carbonate de calcium ..... 45,0 g
Eau ..... 1000 ml

PREPARATION :

— Ajouter les composants de base déshydratés ou le milieu de base complet déshydraté à l'eau, en portant à ébullition jusqu'à dissolution complète des composants solubles.

— Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 ± 0,1

— Stériliser le milieu de base durant 15 min. à 121 ± 1°C.

3.2.2.2 **SOLUTION DE THIOSULFATE DE SODIUM**

COMPOSITION :

Thiosulfate de sodium pentahydraté
(Na_2S203, $5H_2O$) ..... 50,0 g
Eau, quantité suffisante pour ..... 100 ml

PREPARATION :

— Dissoudre le thiosulfate de sodium dans une partie de l'eau.

— Compléter au volume final.

— Stériliser la solution durant 15 min. à 121 ± 1°C.

3.2.2.3 **SOLUTION D'IODE**

COMPOSITION :

Iode ..... 20,0 g
Iodure de potassium ..... 25,0 g
Eau, quantité suffisante pour .....…… 100 ml

PREPARATION :

— Dissoudre l'iodure de potassium dans un petit volume d'eau et ajouter l'iode.

— Agiter jusqu'à dissolution complète.

— Compléter au volume final.

— Conserver la solution dans un récipient opaque complètement fermé.

3.2.2.4 **SOLUTION DE VERT BRILLANT**

COMPOSITION :

Vert brillant ……..... 0,5 g
Eau .....…….... 100 ml

PREPARATION :

— Ajouter le vert brillant à l'eau.

— Conserver la solution au moins une journée à l'obscurité pour permettre l'autostérilisation.

3.2.2.5 **SOLUTION DE BILE DE BŒUF**

COMPOSITION :

Bile de bœuf desséchée .....…….... 10,0 g
Eau .....……...100 ml

PREPARATION :

— Dissoudre la bile de bœuf desséchée dans l'eau en portant à ébullition ;

— Stériliser la solution durant 15 min. à 121 ± 1°C.

3.2.2.6 **MILIEU COMPLET**

COMPOSITION :

Milieu de base (3.2.2.1) .....……..... 900 ml
Solution de thiosulfate de sodium (3.2.2.2) ……. 100 ml
Solution d'iode (3.2.2.3) .....…. 20 ml
Solution de vert brillant (3.2.2.4) .....…..... 2 ml
Solution de bile de bœuf (3.2.2.5) .....…..……..... 50 ml

PREPARATION :

— Ajouter aseptiquement au milieu de base les autres composants dans l'ordre donné ci-dessus. Bien mélanger les liquides après chaque addition.

— Répartir stérilement le milieu complet, par quantités de 100 ml, dans des flacons stériles de 500 ml de capacité.

— Conserver à 0,5 °C à l'obscurité mais utiliser dans la semaine qui suit la préparation.

3.2.3 **PREMIER MILIEU D'IDENTIFICATION : Gélose au rouge de phénol et au vert brillant (Edel & Kampelmacher)**

3.2.3.1 **MILIEU DE BASE**

COMPOSITION :

Extrait de viande en poudre .....……..... 5,0 g
Peptone .....…….....10,0 g
Extrait de levure en poudre .....……..... 3,0 g
Hydrogéno-orthophosphate disodique (Na_2HPO_4) .....…….....1,0 g
Dihydrogéno-orthophosphate de sodium (NaH_2PO4)..... 0,6 g
Agar-agar ..... 12,0 à 18,0 g
Eau .....…..... 900 ml

PREPARATION :

— Dissoudre les composants de base déshydratés ou le milieu de base complet déshydraté dans l'eau, en portant à ébullition.

— Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 ± 0,1.

— Répartir le milieu de base dans des tubes ou des flacons stériles de 500 ml de capacité maximale.

3.2.3.2 **SOLUTION DE SUCRE AU ROUGE DE PHENOL**

COMPOSITION :

Lactose ..... 10,0 g
Saccharose ..... 10,0 g
Rouge de phénol .....… 0,09 g
Eau, quantité suffisante pour ..... 100 ml

PREPARATION :

— Dissoudre les ingrédients dans l'eau.

— Chauffer au bain d'eau durant 20 min à 70° C.

— Refroidir à 55° C et utiliser immédiatement.

3.2.3.3 **MILIEU COMPLET**

COMPOSITION :

Milieu de base (3.2.3.1) .....…..... 900 ml
Solution de sucres au rouge de phénol (3.2.3.2)..100 ml
Solution de vert brillant. (3.2.2.4)……..... 1 ml

PREPARATION :

— Ajouter aseptiquement la solution de vert brillant à la solution de sucres au rouge de phénol refroidie à 55° C.

— Ajouter au milieu de base fondu et maintenu de 50 à 55° C et mélanger.

3.2.3.4 **PREPARATION DES BOITES**

— Répartir le milieu complet refroidi à 45 ° C, par quantités d'environ 15 ml, dans des boîtes de Pétri stériles de 90 mm de diamètre et laisser se solidifier.

— Juste avant l'emploi, sécher soigneusement les boîtes de milieu gélosé, de préférence après avoir retiré les couvercles et retourné les boîtes, dans une étuve ou un incubateur réglé à 50 ± 5° C durant 30 minutes.

— Les boîtes de milieu gélosé non séchées ne doivent pas être conservées plus de 4 h à la température du laboratoire ou plus de 24h de 0 à 5° C.

3.2.4 **SECOND MILIEU D'IDENTIFICATION: GELOSE AU SULFITE DE BISMUTH**

COMPOSITION :

Peptone ..... 10,0 g
Extrait de bœuf ..... 5,0 g
Glucose ..... 5,0 g
Hydrogéno-orthophosphate disodique ..... 4,0 g
Sulfate de fer (II) ..... 0,3 g
Citrate de bismuth ammoniacal ..... 1,85 g
Sulfite de sodium ..... 6,15 g
Agar-agar ..... 20,0 g
Vert brillant ..... 0,025 g
Eau ..... 1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre les ingrédients dans l'eau, en portant à ébullition durant environ 1 min.

— Ajuster le pH à 7,7 ± 0, 1.

— Refroidir entre 45 °C et 50 ° C en agitant doucement le précipité en suspension.

— Ne pas stériliser le milieu.

— Répartir le milieu, par quantités de 20 ml, dans des boîtes de Pétri stériles (de 90 mm de diamètre) et laisser se solidifier.

— Juste avant l'emploi, sécher soigneusement les boîtes de milieu gélosé, de préférence après avoir retiré les couvercles et retourné les boîtes, dans une étuve ou un incubateur réglé à 50 ± 5° C durant 30 minutes.

— Utiliser les boîtes séchées entre 24 et 48 h après leur préparation. Les conserver à l'obscurité.

3.2.5 **GELOSE NUTRITIVE**

COMPOSITION :

Extrait de viande ..... 3,0 g
Peptone ..... 5,0 g
Agar-agar ..... 12,0 g
Eau ..... 1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre les composants déshydratés du milieu ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en portant à ébullition.

— Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 ± 0,1.

— Répartir le milieu de culture dans des tubes ou des flacons stériles de 500 ml de capacité maximale.

— Stériliser le milieu durant 20 minutes à 121 ± 1°C.

PREPARATION DES BOITES DE GELOSE NUTRITIVE

Verser environ 15 ml du milieu fondu dans des boîtes de Pétri stériles (de 90 mm de diamètre) et procéder comme spécifié en (3.2.3.4).

3.2.6 **GELOSE AU CITRATE DE FER ET AUX TROIS SUCRES (GELOSE TSI)**

COMPOSITION

Extrait de viande ..... 3,0 g
Extrait de levure ..... 3,0 g
Peptone ..... 20,0 g
Chlorure de sodium ..... 5,0 g
Lactose ..... 10,0 g
Saccharose ..... 10,0 g
Glucose ..... 1,0 g
Citrate de fer (III) ..... 0,3 g
Thiosulfate de sodium ..... 0,3 g
Rouge de phénol ..... 0,024 g
Agar-agar ..... 12,0 g
Eau ..... 1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre les composants du milieu déshydraté ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en portant à ébullition.

— Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,4 ± 0,1.

— Répartir le milieu, par quantités de 10 ml, dans des tubes de 17 mm à 18 mm de diamètre.

— Stériliser le milieu durant 10 min à 121 ± 1° C.

— Laisser reposer en position inclinée de façon à obtenir un culot de 2,5 cm de profondeur et une pente de 4 cm à 5 cm.

3.2.7 **GELOSE POUR LA RECHERCHE A L'UREASE (CLIRISTENSEN)**

3.2.7.1 **MILIEU DE BASE**

COMPOSITION :

Peptone ..... 1,0 g
Glucose ..... 1,0 g
Chlorure de sodium ..... 5,0 g

Dihydragéno-orthophosphate de potassium

(KH_2PO_4) ..... 2,0 g

Rouge de phénol .....…… 0,012 g

Agar - agar..... 15,0 g

Eau .....……..... 1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre les composants de base déshydratés ou le milieu de base complet déshydraté dans l'eau, en portant à ébullition.

— Ajuster le pH si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6,8 ± 0,1.

— Stériliser le milieu de base durant 15 min à 121 ± 1°C.

3.2.7.2 **SOLUTION D'UREE**

COMPOSITION :

Urée .....……..... 400 g

Eau, quantité suffisante pour .....…….....1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre l'urée dans l'eau.

— Stériliser par filtration et contrôler la stérilité. (selon la technique de stérilisation par filtration).

3.2.7.3 **MILIEU COMPLET**

COMPOSITION :

Milieu de base (3.2.7.1) ….……..... 950 ml

Solution d'urée (3.2.7.2) .....…….....…….. 50 ml

PREPARATION :

— Ajouter stérilement la solution d'urée au milieu de base préalablement fondu puis refroidi à 45° C.

— Répartir le milieu complet, par quantités de 10 ml, dans des tubes stériles.

— Laisser reposer en position inclinée.

3.2.8 **MILIEU DE DECARBOXYLATION A LA LYSINE**

COMPOSITION :

Monohydrochlorure de L-lin .....……..... 5,0 g

Extrait de levure .....……..... 3,0 g

Glucose .....…….....…… 1,0 g

Pourpre de bromocrésol ..... 0,015 g

Eau .....……..... 1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre les composants dans l'eau, en portant à ébullition.

— Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 ± 0,1.

— Répartir le milieu, par quantités de 5 ml, dans des tubes de culture d'environ 8 mm de diamètre et 160 mm de longueur. Stériliser le milieu durant 10 minutes à 121 ± 1°C.

3. 3 **REACTIFS**

3. 3.1 **SOLUTION SALINE**

COMPOSITION :

Chlorure de sodium .....…….....…… 8,5 g

Eau .....…..……..…… 1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre le chlorure de sodium dans l'eau, en portant à ébullition.

— Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 ± 0,1.

— Répartir la solution dans des flacons ou dans des tubes, de sorte qu'après stérilisation, ils contiennent 90 à 100 ml de solution.

— Stériliser la solution durant 15 minutes à 121 ± 1°C.

3. 3. 2 **REACTIFS POUR LA RECHERCHE DE ß-GALACTOSIDASE**

3. 3. 2.1 **TOLUENE**

3. 3. 2. 2 **SOLUTION TAMPON**

COMPOSITION :

Dihydrogéno-orthophosphate de sodium

(NaH_2PO_4.) .....….....…..... 6,9 g

Hydroxyde de sodium, Sol. 0, 1 mol/l .....…..….... 3 ml

Eau, quantité suffisante pour.....……..…...50 ml

PREPARATION :

— Dissoudre le dihydrogéno-orthophosphate de sodium dans environ 45 ml d'eau.

— Ajuster le PH à 7,0 ± 0,l avec environ 3 ml de la solution d'hydroxyde de sodium.

— Compléter à 50 ml avec de l'eau.

3.3.2.3 **SOLUTION d'Orthonitrophényl - ß - D - galactopyranoside (ONPG)**

COMPOSITION :

(ONPG) ……..…….. 0,08 g

Eau .....…….....….. 15 ml

PREPARATION :

— Dissoudre l'ONPG dans l'eau à 50° C.

— Refroidir la solution.

3. 3. 2. 4 **REACTIF COMPLET**

COMPOSITION :

Solution tampon (3.3.2.2) ..... 5 ml

Solution d'ONPG (3.3.2.3) ..... 15 ml

PREPARATION :

Ajouter la solution tampon à la solution d'ONPG.

3.3.3 **REACTIFS POUR LA REACTION DE VOGES-PROSKAUER (VP).**
(METHODE RAPIDE DE BARRY ET FEENEY)

3.3.3.1 **MILIEU VP**

COMPOSITION :

Peptone ..... 7,0 g

Glucose ..... 5,0 g

Hydrogéno-orthophosphate dipotassique ..... 5,0 g (K_2HPO_4)

Eau ..... 1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre les composants dans l'eau.

— Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation , il soit de 7,0 ± 0 ,1.

— Répartir 3 ml de milieu dans chacun des tubes.

— Stériliser le milieu durant 15 minutes au maximum, à 121±1° C.

3. 3. 3. 2 **SOLUTION DE CREATINE**

COMPOSITION :

Créatine monohydratée (N-amidinosarcosine)…… 0,5 g

Eau ..... 100 ml

PREPARATION :

Dissoudre la créatine monohydratée dans l'eau.

3.3.3.3 **SOLUTIO ETHANOLIQUE DE NAPHTOL-1**

COMPOSITION :

Naphtol-1 ..... 6 g

Ethanol, à 96 % (V/V) ..... 100 ml

PREPARATION :

Dissoudre le naphtol-1 dans l'éthanol.

3.3.3.4 **SOLUTION D'HYDROXYDE DE POTASSIUM**

COMPOSITION :

Hydroxyde de potassium ..... 40 g

Eau ..... 100 ml

PREPARATION :

Dissoudre l'hydroxyde de potassium dans l'eau.

3.3.4 **REACTIFS POUR LA REACTION DE L'INDOLE**

3.3.4.1 **MILIEU TRYPTONE - TRYPTOPHANE (DE L - JUTOV)**

COMPOSITION :

Tryptone ..... 10 g

Chlorure de sodium ..... 5 g

DL-Tryptophane ..... 1 g

Eau ..... 1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre les composants dans l'eau, en portant à ébullition, et filtrer.

— Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,5 ± 0,1.

— Répartir 5ml de milieu dans chacun des tubes.

— Stériliser 1e milieu durant 15 min à 121 + 1° C.

3.3.4.2 **REACTIF DE KOWACS**

COMPOSITION :

Diméthylarnino-4 benzaldéhyde,..... 5 g

Acide chlorhydrique, 1,18 à 1, 19 g/ml ..... 25 ml

Méthyl - 2 butanol - 2 ..... 75 ml

PREPARATION :

Mélanger les composants.

3.3.5 **GELOSE NUTRITIVE SEMI-SOLIDE**

COMPOSITION :

Extrait de viande ..... 3,0 g

Peptone ..... 5,0 g

Agar-agar.....4 à 9 g

Eau.....1000 ml

PREPARATION :

— Dissoudre les composants de base déshydratés dans l'eau, en portant à ébullition.

— Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 ± 0,1

— Répartir le milieu dans des flacons de 500 ml de capacité maximale.

— Stériliser le milieu durant 15 minutes à 121 ± 1°C.

PREPARATION DES BOITES DE GELOSE

Répartir le milieu complet, récemment préparé, dans des boîtes de Pétri par quantité d'environ 15 ml. Les boîtes ne doivent pas être séchées.

3.4 **SERUMS**

Il existe plusieurs sérums anti-salmonella contenant un ou plusieurs groupes "O" (dénommés anti- sérums O monovalents ou polyvalents), des anti-sérums Vi et des anti-sérums contenant des anticorps pour un ou plusieurs facteurs « H » (dénommés anti-sérums H monovalents). Pour chaque sérum, suivre les instructions d'utilisation .

4. **APPAREILLAGE ET VERRERIE**

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment :

4.1 **APPAREILLAGE**

4.1.1 **APPAREILS POUR LA STERILISATION EN CHALEUR SECHE (FOUR) OU EN CHALEUR HUMIDE (AUTOCLAVE).**

Le matériel en contact avec les milieux de culture, le diluant et l'échantillon, sauf s'il est livré stérile et particulièrement celui en plastique, doit être stérilisé :

— soit au four en le maintenant à une température comprise entre 170 °C et 175° C durant au moins 1 heure;

— soit à l'autoclave en le maintenant à une température de 121 ± 1°C durant au moins 20 minutes.

Un autoclave est également nécessaire pour la stérilisation des milieux de culture et des réactifs. Il doit être réglable à 121 ± 1°C.

4.1.2 **Enceinte de séchage** : étuve ou incubateur, ventilé(e) (permettant de sécher la surface des milieux gélosés coulés en boîtes), réglable à 50 ± 5°C.

4.1.3 **Incubateur, réglable** à 37 ± 1°C.

4.1.4 **Incubateur, réglable** à 43 ± 0,5°C.

4.1.5 **Bains marie. réglables** à 45 ±1°C et à 37 ± 1°C.

4.1.6 **Homogénéisateurs.**

L'un des appareils suivants doit être utilisé :

a) homogénéisateur rotatif, fonctionnant à une fréquence de rotation comprise entre 8000 t/min. et 45000 t/min , avec des récipients en verre ou en métal, munis de préférence de couvercles et résistant aux conditions de stérilisation ;

b) Homogénéisateur de type péristaltique, avec des sacs en plastique stériles.

Les récipients ou les sacs en plastique doivent être de capacité suffisante pour permettre le mélange correct de l'échantillon pour essai avec le diluant. En général, le volume du récipient doit être égal à environ deux fois le volume de l'échantillon et du diluant.

4.1.7 **Anses bouclées**, en platine ou en nickel-chrome, d'environ 3 mm de diamètre.

4.1.8 **pH-mètre** (permettant de mesurer le pH des milieux et réactifs préparés), avec une précision de réglage de ± 0,1 unité de pH à 25° C.

4.1.9 **Réfrigérateur** (permettant de conserver les milieux et réactifs préparés), réglable à 0 - 5° C

4.2 **VERRERIE**

La verrerie doit pouvoir résister à des stérilisations répétées.

4.2.1 **Flacons de culture** , pour la stérilisation et la conservation des milieux de culture et l'incubation des milieux liquides.

4.2.2 **Tubes de culture** , de 8 mm de diamètre et 160 mm de longueur, pour le milieu de décarboxylation à la lysine.

4.2.3 **Eprouvettes graduée** s, pour la préparation des milieux complets.

4.2.4 **Pipettes graduées** en verre de 25 ml, 10 ml et 1 ml, graduées respectivement en 0,5 ml et 0,1 ml.

4.2.5**. Boîtes de Pétri.**

5. **ECHANTILLONNAGE**

L'échantillonnage se fait dans des conditions appropriées.

6. **PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI.**

6.1 **LAIT**

— Agiter vigoureusement l'échantillon pour essai afin d'assurer une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes , en inversant rapidement 25 fois le récipient avec l'échantillon. Il faut éviter la formation de mousse ou bien la laisser se disperser.

— L'intervalle entre le mélange et le prélèvement de l'échantillon pour essai ne doit pas dépasser 3 minutes.

6.2 **LAIT SEC, POUDRE DE LACTOSERUM, BABEURRE EN POUDRE , LACTOSE , CASEINE**

— Mélanger soigneusement le contenu du récipient fermé en secouant manuellement et en inversant de façon répétée. Si le récipient est trop rempli pour permettre une agitation vigoureuse, prendre un récipient plus grand pour mélanger.

6.3 **BEURRE**

— Faire fondre l'échantillon dans un récipient stérile dans un bain-marie maintenu à 45° C ± 1° (4.1.5.).

— Agiter lorsqu'on fait fondre et retirer le récipient immédiatement du bain-marie lorsque l'échantillon vient d'être fondu.

6.4 **FROMAGE**

Habituellement, un (1) échantillon pour laboratoire constituera l'échantillon pour essai. Procéder alors comme au point (7.1.5).

6.5 **GLACES DE CONSOMMATION**

Procéder comme dans le cas du beurre (6.3) mais en utilisant un bain-marie maintenu à 37° C (4.1.5), de façon que l'échantillon ne doit pas dépasser cette température.

6.6 **LAITS FERMENTES, YAOURTS, CREMES-DESSERT**

Mélanger le contenu du récipient fermé, en secouant manuellement et en inversant de façon répétée, et ouvrir le récipient et mélanger le contenu aseptiquement à l'aide d'une spatule ou d'une cuillère stérile.

7. **MODE OPERATOIRE**

7.1 **PRISE D'ESSAI ET PREENRICHISSEMENT**

— Introduire la prise d'essai dans le milieu de pré-enrichissement et opérer comme décrit en (7.1.1) à (7.1.7).

— Pour une récapitulation des modes opératoires de pré-enrichissement et d'enrichissement, se reporter au tableau 1.

7.1.1 **LAIT**

Un pré-enrichissement n'est pas nécessaire, se reporter à (7.2) en utilisant 25 ml de l'échantillon pour essai et 225ml du milieu d'enrichissement, respectivement.

7.1.2 **LAIT SEC**

— Préparer un flacon bouché contenant 225 ml d'eau distillée stérile et 1 ml de la solution de vert brillant (3.2.2.4). Peser aseptiquement 25 g de l'échantillon pour essai et le verser à la surface du liquide dans le flacon.

— Boucher le flacon, mais ne pas l'agiter. Laisser reposer à la température ambiante durant 60 ± 10 minutes avant incubation. L'ajustement du pH n'est pas nécessaire.

Si après 3 heures d'incubation, le lait sec n'est pas encore dissout, mélanger le contenu du flacon par agitation.

7.1.3 **LAIT SEC. BABEURRE SEC**

— Peser aseptiquement 25 g de l'échantillon pour essai dans un flacon bouché contenant 225 ml d'eau distillée stérile.

— Agiter jusqu'à dissolution et ajouter 1 ml de la solution de vert brillant (3.2.2.4).

7.1.4 **LACTOSE**

Peser aseptiquement 25 g de l'échantillon pour essai dans un flacon bouché contenant 225 ml du milieu de pré-enrichissement (3.2.1) et agiter jusqu'à dissolution.

7.1.5 **CASEINE FROMAGE**

— Peser aseptiquement 25 g de l'échantillon pour essai dans le récipient stérile d'un homogénéisateur à grande vitesse ou de type péristaltique (4.1.6) et ajouter 225 ml du milieu de pré-enrichissement (3.2.1) à 45° C.

— Mélanger jusqu'à ce que la prise d'essai soit totalement dispersée (1 à 3 minutes).

S'assurer que la température de dispersion ne dépasse pas 45°C.

7.1.6 **BEURRE**

— Agiter l'échantillon pour essai fondu, et à l'aide d'une pipette, porter à environ 45 ° C, en introduire 25 ml dans un flacon contenant 225 ml du milieu de pré-enrichissernent (3.2.1). Mélanger.

7.1.7 **PRODUITS LAITIERS CONGELES** (y compris les glaces de consommation).

Introduire, à l'aide d'une pipette, 25 ml de l'échantillon pour essai fondu, dans un flacon contenant 225 ml du milieu de pré-enrichissement (3.2.1). Mélanger.

7.1.8. **LAITS FERMENTES, YAOURTS, CREMES-DESSERT**

— Peser aseptiquement 25 g de l'échantillon pour essai dans un flacon bouché contenant des billes de verre et 225 ml du milieu de pré-enrichissement (3.2.1) et agiter pour disperser.

— Sauf spécifications contraires, contrôler le pH de la suspension et l'ajuster , si nécessaire, à 7,0.

7.1.9 **INCUBATION**

Incuber les flacons préparés conformément à (7.1.2) jusqu'à (7.1.8), à 37° C durant 16 h. à 20 heures.

7.2 **ENRICHISSEMENT**

7.2.1 Transférer, à l'aide d'une pipette, 10 ml du milieu de pré-enrichissement incubé (7.1) dans un flacon contenant 100 ml du milieu d'enrichissement sélectif au tétrathionate (3.2.2).

Dans le cas du lait, transférer aseptiquement 25 ml de l'échantillon pour essai dans 225 ml du milieu au tétrathionate (3.2.2).

7.2.2 Incuber le milieu au tétrathionate inoculé durant 18 h. à 24 heures à 43 °C ± 0,5.

7.3 **ENSEMENCEMENT ET IDENTIFICATION**

7.3.1 Ensemencer avec une anse, à partir de la culture du milieu d'enrichissement, la surface d'une boîte de gélose au vert brillant et au rouge de phénol (3.2.3) et d'une boîte de gélose au sulfite de bismuth (3.2.4), de façon à permettre le développement de colonies bien isolées.

Remettre le milieu d'enrichissement en incubation (voir 7.3.3).

7.3.2 Incuber les boîtes (retournées) à 37 ±1°C durant 20 h. à 24 heures.

7.3.3 Après incubation des flacons durant encore 18 h. à 24 heures, répéter les opérations d'ensemencement et d'incubation décrites en (7.3.1) et (7.3.2).

7.3.4 Examiner les boîtes (7.3.2) et (7.3.3) après incubation afin de rechercher la présence de colonies typiques de salmonella. Si le développement est faible, et s'il n'y a pas de colonies typiques de salmonella, incuber à nouveau les boîtes à 37 ± 1°C durant 18 h. à 24 heures et réexaminer les boîtes pour rechercher la présence de colonies typiques de salmonella.

7.3.5 Les colonies typiques de salmonella peuvent être caractérisées comme suit :

— sur gélose au vert brillant / rouge de phénol (3.2.3), les colonies typiques de salmonella sont roses bordées de rouge.

— sur gélose au sulfite de bismuth (3.2.4), les colonies typiques de salmonella sont brunes ou noires avec un éclat métallique. Certaines souches donnent des colonies vertes.

Tableau 1 – **Récapitulation des modes opératoires de pré-enrichissement et d'enrichissement**

Produit	Taille de l'échantillon	Milieu de pré-enrichissement*	Méthode de préparation	Milieu d'enrichissement
Lait	50 ml (2x25ml)	Néant	Mélanger	225ml de tétrathionate
Lait sec	25 g	Eau distillée plus solution de vert brillant	Imprégner pendant 60 ± 10 mn ne pas mélanger * *	100ml de tétrathionate
Lacto-sérum sec Babeurre sec	25 g	Eau distillée plus solution de vert brillant	Mélanger	100ml de tétrathionate
Lactose	25 g	225 ml d'eau peptonée tamponnée	Mélanger	100ml de tétrathionate
Caséine, Fromage	25 g	225 ml d'eau peptonée tamponnée	Mélanger à 45°C max.	100ml de tétrathionate
Beurre	25 g	225 ml d'eau peptonée tamponnée	Mélanger	100ml de tétrathionate
Produits laitiers congelés	25 ml	225 ml d'eau peptonée tamponnée	Mélanger	100ml de tétrathionate
Laits fermentés Yaourts, Crèmes dessert	25 g	225 ml d'eau peptonée tamponnée	Mélanger	100ml de tétrathionate

(*) Lorsque le milieu de pré-enrichissement est utilisé, après incubation de 20 h à 37 °C, repiquer 10 ml de l'échantillon incubé, mélanger au milieu de pré-enrichissement dans le milieu d'enrichissement.

(**) Si après 3 h d'incubation, le lait sec n'est pas encore dissous, mélanger le contenu des flacons par agitation.

7.4 **CONFIRMATION**

7.4.1 **CHOIX DES COLONIES POUR LES CONFIRMATIONS**

A partir de chaque boîte de chacun des milieux sélectifs (7.3.5), prélever 5 colonies typiques ou suspectes ou, s'il y a moins de 5 colonies typiques ou suspectes, les prélever toutes pour confirmation.

7.4.2 **INCUBATION**

Ensemencer les colonies sélectionnées sur la surface des boîtes de gélose nutritive (3.2.5) de façon à permettre le développement de colonies bien isolées et incuber les boîtes à 37 ±1 °C durant 18 h. à 24 heures.

Après incubation, retenir les colonies pures bien isolées pour les confirmations biochimiques et sérologiques.

7.4.3 **CONFIRMATION BIOCHIMIQUE**

A l'aide d'un fil à ensemencement, ensemencer les milieux suivants avec les colonies pures.

7.4.3.1 **GELOSE TSI (3.2.6)**

Ensemencer la pente de la gélose par des stries et le culot par piqûre.

Incuber durant 24 h à 37 ± 1°C.

Interpréter les modifications du milieu de la façon suivante :

Culot

Jaune ..... : glucose positif
(fermentation du glucose)
Rouge ou inchangé .. : glucose négatif
(pas de fermentation du glucose)
Noir ..... : formation de sulfure d'hydrogène
Bulles ou fissures .... : formation de gaz à partir du glucose

Pente

Jaune ……..... : lactose et/ou saccharose positifs (fermentation du lactose et/ou du saccharose)
Rouge ou inchangé. : lactose et saccharose négatifs (pas de fermentation du lactose ni du saccharose)

7.4.3.2 **GELOSE POUR LA RECHERCHE A 1'UREASE (3.2.7)**

Ensemencer par des stries la pente de la gélose.

Incuber durant 24 h à 37 C ± 1°.

La présence d'uréase produit un dégagement d'ammoniac faisant virer le rouge de phénol au rose puis au rouge foncé lorsque la réaction est positive.

7.4.3.3 **MILIEU DE DECARBOXYLATION A LA LYSINE (3.2.8)**

— Ensemencer le milieu juste au-dessous de la surface du liquide.

— Incuber durant 24 h à 37 ± 1°C.

Une couleur violette, après incubation indique une réaction positive.

Une couleur jaune indique une réaction négative.

7.4.3.4 **REACTIF POUR LA RECHERCHE DE LA β GALACTOSIDASE (3.3.2)**

— Mettre en suspension une anse de la colonie suspecte dans un tube contenant 0,25 ml de la solution saline (3.3.1).

— Puis ajouter une goutte de toluène et agiter le tube.

— Mettre le tube au bain marie à 37 ± 1°C durant plusieurs minutes.

— Puis ajouter 0,25 ml du réactif pour la recherche de la b-galactosidase et mélanger.

— Replacer le tube dans le bain marie à 37 ± 1°C durant 24 heures.

Une couleur jaune indique une réaction positive.

La réaction est souvent visible au bout de 20 minutes.

7.4.3.5 **MILIEU POUR LA REACTION DE VOGES - PROSKAUER (V.P) (3.3.3) :**

— Ensemencer deux tubes par suspension d'une anse de la colonie suspecte dans 0,2 ml du milieu VP (3.3.3.1) dans chaque tube.

— Incuber un tube à la température ambiante et l'autre à 37° C durant 24 heures.

Après incubation, ajouter à chaque tube 2 gouttes de la solution de créatine (3.3.3.2), 3 gouttes de la solution éthanolique naphtol-1 (3.3.3.3), puis 2 gouttes de la solution d'hydroxyde de potassium (3.3.3.4); agiter les deux tubes après avoir ajouté chaque réactif.

Un virage du rose au rouge vif dans un délai de 15 minutes indique une réaction positive.

7.4.3.6 **MILIEU POUR LA REACTION DE L'INDOLE (3.3.4) :**

— Ensemencer avec une partie de la colonie un tube contenant 5 ml du milieu tryptone-tryptophane (3.3.4.1).

— Incuber durant 24 h. à 37 ±1° C.

— Après incubation, ajouter 2 à 3 gouttes du réactif Kowacs (3.3.4.2).

La formation d'un anneau rouge indique une réaction positive.

Un anneau jaune - brun indique une réaction négative.

TABLEAU 2

INTERPRETATION DES RESULTATS

Essais de confirmation	Réaction positive ou négative	Pourcentage de souches de salmonella présentant la réaction
Glucose TSI (Formation d'acide) (7.4.3.1)	+	100
Glucose TSI (Formation de gaz) (7.4.3.1)	+	91,9
Lactose TSI (7.4.3.1)	- (1)	99,2
Saccharose TSI (7.4.3.1)	-	99,5
Sulfure d'hydrogène TSI (7.4.3.2.)	+	91,6
Décomposition de l'urée (7.4.3.2)	-	100
Décarboxylation à la lysine (7.4.3.3)	+	94,6
Réaction de la β galactosidase (7.4.3.4)	- (2)	98,5
Réaction de Voges-Proskauer (7.4.3.5)	-	100
Réaction de l'indole (7.4.3.6)	-	98,9

INTERPRETATION DES ESSAIS BIOCHIMIQUES

Interpréter les résultats selon le tableau 2.

TABLEAU 2

INTERPRETATION DES RESULTATS

(Voir tableau 2).

(1) Les salmonella du sous-genre III (Arizona) donnent une réaction positive ou négative au lactose mais toujours une réaction positive à la β galactosidase.

(2) Les salmonella du sous-genre II donnent une réaction négative au lactose, mais peuvent donner une réaction positive à la β galactosidase.

7.4.4 **SYSTEMES DE DIAGNOSTIC RAPIDE**

Les systèmes de diagnostic rapide (3.1) peuvent être utilisés à la place des opérations décrites en (7.4.3) pour la confirmation biochimique des colonies typiques ou suspectes.

Dans ce cas, les instructions d'utilisation doivent être scrupuleusement suivies.

7.4.5 **CONFIRMATION SEROLOGIQUE**

La détection de la présence des antigènes O, Vi et H des salmonella est effectuée par une agglutination sur lame avec des sérums appropriés, sur des colonies pures (7.4.1) après l'élimination des souches auto-agglutinables.

7.4.5.1 **ELIMINATION DES SOUCHES AUTO - AGGLUTINABLES**

— Déposer sur une lame de verre parfaitement propre une goutte de la solution saline (3.3.1).

— Disperser dans cette goutte, une partie de la colonie (7.4.2) à essayer afin d'obtenir une suspension homogène et trouble.

— Faire osciller la lame durant 30 secondes à 60 secondes.

— Observer les résultats sur fond noir, de préférence avec l'aide d'une loupe.

— Les souches sont considérées comme auto-agglutinables si les bactéries ont floculé en amas plus ou moins distincts. La confirmation sérologique de ces souches auto-agglutinables par les modes opératoires spécifiés en (7.4.5.2), (7.4.5.3) et (7.4.5.4) est impossible.

7.4.5.2 **MISE EN EVIDENCE DES ANTIGENES O**

— Utiliser des souches pures (7.4.2) non auto-agglutinables (7.4.5.1).

— Opérer comme en (7.4.5.1), mais utiliser une goutte d'anti-sérum O (3.4) à la place de la solution saline.

— Utiliser les sérums mono ou polyvalents l'un après l'autre.

7.4.5.3 **MISE EN EVIDENCE DES ANTIGENES Vi**

Opérer comme en (7.4.5.2), mais utiliser une goutte d'anti-sérum Vi (3.4) à la place de la solution saline.

7.4.5.4 **MISE EN EVIDENCE DES ANTIGENES H**

— Ensemencer la gélose nutritive semi-solide (3.3.5) avec une souche pure non auto-agglutinable (7.4.5.1).

— Incuber le milieu durant 18 h. à 24 heures à 37 ± 1°C.

Utiliser cette culture pour l'examen des antigènes H en opérant comme en 7.4.5.2, mais en utilisant une goutte de l'anti-sérum H (3.4) à la place de la solution saline.

7.4.5.5 **INTERPRETATION DES REACTIONS SEROLOGIQUES**

S'il y a agglutination, les réactions sont considérées comme positives.

7.4.6 **INTERPRETATION DES REACTIONS BIOCHIMIQUES ET SEROLOGIQUES**

7.4.6.1. Les souches sont considérées comme étant des salmonella si elles présentent des réactions biochimiques typiques (7.4.3) et donnent des réactions sérologiques positives suivant (7.4.5).

7.4.6.2 Les souches qui présentent des réactions biochimiques typiques (7.4.3) mais qui ne donnent pas de réactions sérologiques positives suivant (7.4.5), les souches qui ne présentent pas de réactions biochimiques typiques (7.4.3), mais donnent des réactions sérologiques positives suivant (7.4.5), et les souches auto-agglutinables qui présentent des réactions biochimiques typiques (7.4.3) peuvent être des salmonella.

7.4.6.3 Les souches ne sont pas considérées comme étant des salmonella si elles ne présentent pas de réactions biochimiques typiques (7.4.3) et ne donnent pas de réactions sérologiques positives suivants (7.4.5).

7.4.7 **CONFIRMATION DEFINITIVE**

Pour les souches considérées comme étant des salmonella (7.4.6.1) ou pouvant l'être (7.4.6.2), une identification doit être effectuée en vue d'une détermination définitive du sérotype .

8. **CULTURES DE CONTROLE**

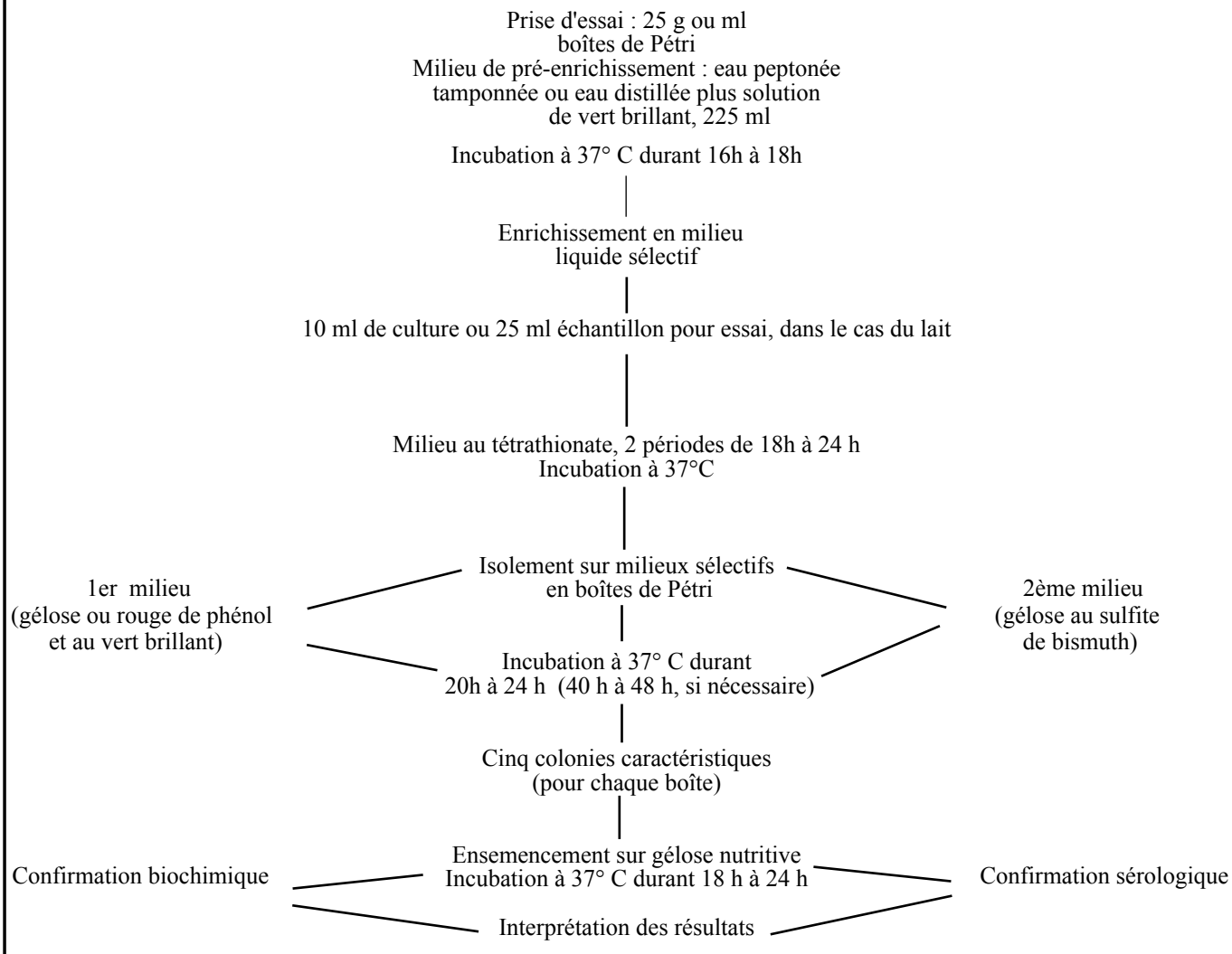
Pour vérifier la capacité des milieux d'enrichissement et d'identification de supporter le développement de salmonella, une souche de référence isolée nouvellement doit être utilisée pour contrôler les milieux d'enrichissement (7.2).

Les opérations de contrôle doivent alors suivre celles des cultures du matériau d'essai pour montrer qu'on retrouve la culture contrôle positive.

9. **EXPRESSION DES RESULTATS**

Selon les résultats de l'interprétation, indiquer la présence ou l'absence de salmonella dans la prise d'essai, en précisant la masse, en grammes, ou le volume, en millilitres, de l'échantillon analysé.

Schéma du mode opératoire


Prise d'essai : 25 g ou ml
boîtes de Pétri
Milieu de pré-enrichissement : eau peptonée tamponnée ou eau distillée plus solution de vert brillant, 225 ml
Incubation à 37° C durant 16h à 18h
Enrichissement en milieu liquide sélectif
10 ml de culture ou 25 ml échantillon pour essai, dans le cas du lait
Milieu au tétrathionate, 2 périodes de 18h à 24 h
Incubation à 37°C
Isolement sur milieux sélectifs en boîtes de Pétri
1er milieu (gélose ou rouge de phénol et au vert brillant)
2ème milieu (gélose au sulfite de bismuth)
Incubation à 37° C durant 20h à 24 h (40 h à 48 h, si nécessaire)
Cinq colonies caractéristiques (pour chaque boîte)
Ensemencement sur gélose nutritive
Incubation à 37° C durant 18 h à 24 h
Confirmation biochimique
Confirmation sérologique
Interprétation des résultats

Arrêté du 13 Dhou El Hidja 1425 correspondant au 23 janvier 2005 rendant obligatoire une méthode d'analyse microbiologique du beurre.

Le ministre du commerce ;

Vu le décret présidentiel n° 04-138 du 6 Rabie El Aouel 1425 correspondant au 26 avril 2004 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n °90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n ° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Vu l'arrêté du 21 Chaâbane 1419 correspondant au 10 décembre 1998 relatif aux spécifications techniques des beurres et modalités de leur mise à la consommation ;

Arrête :

Article. 1er — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n ° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode d'analyse microbiologique du beurre.

Art. 2. — Pour l'analyse microbiologique du beurre, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode d'analyse microbiologique décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 13 Dhou El Hidja 1425 correspondant au 23 janvier 2005.

Noureddine BOUKROUH.

ANNEXE

Méthode d'analyse microbiologique du beurre

1- Echantillonnage

Le contrôle doit porter sur 5 préemballages issus d'un lot de même fabrication.

Selon la masse conditionnée dans un préemballage, le prélèvement sera constitué de la manière suivante :

- Poids unitaire inférieur à 1 kg : 5 préemballages intacts de 125 g à 250 g.

- Poids unitaire supérieur à 1 kg : à partir de 5 préemballages, prélever chacun 5 morceaux de 200 g environ. Le prélèvement sera réalisé au moyen d'une sonde à beurre. Ou prélever d'une manière aseptique par préemballage, l morceau de 300 g à 400 g de produit de forme pyramidale.

Ce nombre de préemballages à examiner concerne les beurres et les corps gras à base de matière grasse butyrique.

Pour le beurre concentré, le contrôle sera effectué sur un échantillon représentatif de l'unité de fabrication ,le prélèvement sera pratiqué selon les modes décrits.

Les prélèvements seront transportés et conservés jusqu'au moment de l'analyse à une température positive n'excédant pas + 6° C.

2- Préparation de l'échantillon pour essai

2.1 Unité préemballée :

Développer soigneusement le papier d'emballage et d'une manière aseptique sans éliminer la couche superficielle, transférer 50 g de produit dans un godet de centrifugation à capsule vissée stérile.

2.2 Prélèvement opéré par sonde à beurre

Transférer d'une manière aseptique 50 g de produit dans le godet de centrifugation.

2.3 Prélèvement sous forme d'une masse pyramidale

A l'aide d'un couteau nettoyé à l'alcool et flambé, enlever la couche superficielle sur 1cm environ d'épaisseur et introduire aseptiquement 50 g de produit dans le godet de centrifugation.

Conservation au réfrigérateur entre 0 °C et + 5 ° C, jusqu'au moment de la préparation de la phase aqueuse.

3 - Préparation de la phase aqueuse, dilution primaire

3.1 Beurre cru et beurre pasteurisé :

Dans le godet de centrifugation contenant 50 g de beurre, transférer 42 ml de solution à 2% de phosphate dipotassique , pH 7,5 ± 0,1 stérile (4).

Faire fondre dans un bain-marie n'excédant pas 45° C.

Dès la fusion du beurre, centrifuger à 1000-2000 t/min. pendant 1 à 2 minutes. Disposer le godet sur un portoir.

Eliminer la matière grasse par aspiration, pour cela utiliser une pipette courte ou un embout en matière synthétique stérile fixée à l'extrémité d'un tube de caoutchouc relié à un ballon à deux tubulures communiquant à une fiole à vide (piège), elle-même reliée à une trompe à eau.

Changer de pipette ou d'embout entre chaque échantillon. Effectuer l'analyse bactériologique sans tarder.

3.2 Corps gras à base de matière grasse butyrique :

Le mode de préparation de la dilution primaire est semblable à celui décrit en (3.1); toutefois, la quantité de solution à 2% de phosphate dipotassique à pH 7,5 ± 0,1 sera calculée selon la teneur en lipides du produit, par exemple :

— Produit dont la teneur en lipides est comprise entre 38 g % et 41 g% utiliser 20 ml de diluant.

— Produit dont la teneur en lipides est supérieure ou inférieure à 38 g% et 41 g% : pour 50 g de produit, utiliser un volume de diluant égal à la moitié de la quantité des lipides présents dans 100 g de produit.

3.3 Beurre concentré

Le mode de préparation de la dilution primaire est semblable à celui décrit en (3.1). mais utiliser comme diluant la solution de tryptone-sel (se reporter à 4) à raison de 50 ml.

En se basant sur la composition type de chaque produit, admettre de manière conventionnelle que 1 ml de la phase aqueuse, dilution primaire, représente 1 g. de produit.

4 - Diluants et préparation des dilutions décimales

4.1 Diluants

Deux diluants sont utilisés, pour des raisons pratiques, distribuer les diluants, solution à 2% de phosphate dipotassique pH 7,5 ± 0,1 et solution de tryptone sel (ou solution de Ringer) de telle sorte qu'après stérilisation, le volume soit de 50 ml.

4.2 Dilutions décimales

Au moment de l'emploi, distribuer la solution de tryptone-sel (ou solution de Ringer) à raison de 9 ml dans des tubes de 20 mm x 200 mm stériles.

Mélanger convenablement la dilution primaire par aspiration et refoulement une dizaine de fois à l'aide d'une pipette de 1 ml stérile, puis introduire 1 ml dans un tube contenant 9 ml de solution de tryptone-sel stérile afin d'obtenir une dilution au 1/10.

Mélanger soigneusement pendant 5 à 10 secondes au moyen d'un agitateur à mouvement de rotation excentré.

De manière identique, préparer une dilution au 1/100 et une dilution au 1/1000.

5 - Expression des résultats

Afin que les résultats de l'analyse bactériologique puissent permettre une évaluation significative de la qualité hygiénique des fabrications de beurres crus, beurres pasteurisés, corps gras à base de matière grasse butyrique et beurres concentrés, il y a lieu de se conformer au protocole décrit afin de restreindre à un minimum les divergences d'ordre technique.

— Durée de l'examen bactériologique : le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la dilution primaire et celui du mélange des dilutions avec le milieu de culture ne doit pas excéder 15 minutes.

— Température d'incubation et refroidissement des milieux : tous les appareils utilisés, étuves, bains-marie, doivent être vérifiés périodiquement (au moins deux fois par mois).

— Lecture des résultats : selon les indications données. Cependant, lorsque les résultats ne peuvent être exprimés correctement, recommencer l'analyse en examinant une gamme plus étendue de dilutions. Si l'examen se situe au-delà des délais de consommation (limite ou optimale), le mentionner sur le bulletin d'analyse.

— Qualité des milieux de culture : d'une manière générale, il est recommandé d'utiliser des milieux complets déshydratés.

5.1 Micro-organismes aérobies à 30 ° C dits de contamination

Ce dénombrement est appliqué aux beurres pasteurisés et concerne les micro-organismes provenant de contaminations diverses qui peuvent se produire au cours de la fabrication du beurre. La flore lactique qui a pu être ensemencée dans la crème selon la technologie employée, doit être exclue de ce dénombrement.

5.1.1 Milieu utilisé

Composition :

Gelysate.....…….7,5 g

Trypticase ou Tryptone .....……7,5 g

Chlorure de sodium.....……..5 g

Gélose (exempte d'hydrates de carbone)…….4 g

Eau distillée.....……1000 ml

Ajuster le pH de sorte, qu'après stérilisation, il soit de 7,6 ± 0,1 à 25° C.

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Conserver au réfrigérateur pendant 1 mois au maximum.

5.1.2 Ensemencement :

Déposer en double dans des boîtes de Pétri 1ml de la dilution 10^{-1}, 1 ml de la dilution 10^{-2} et éventuellement 1 ml de la dilution 10^{-3}. Couler 12 à 15 ml de milieu puis mélanger soigneusement l'inoculum avec le milieu.

Laisser refroidir et après solidification mettre à incuber à 30° C pendant 48 h puis à 20° C ± 1° C pendant 48 h.

5.1.3 Lecture des boîtes :

Retenir pour comptage les boîtes contenant entre 10 et 300 colonies. Dénombrer toutes les colonies en évitant d'inclure dans le comptage les colonies en « pointe d'épingle » qui représentent une flore lactique.

Néanmoins, certaines souches d'espèces lactiques peuvent se développer convenablement et l'attention doit être retenue par la régularité de l'aspect morphologique, colonies lenticulaires ou rondes ; il est alors conseillé d'effectuer l'épreuve de la catalase, celle-ci doit être négative pour les espèces lactiques.

5 1.4 Expression des résultats :

Calculer le nombre de micro-organismes de contamination par millilitre de dilution primaire, c'est-à-dire par gramme de beurre selon le mode de calcul suivant :

— Cas où seuls les comptages d'une dilution sont retenus :

effectuer la moyenne arithmétique.

— Cas où les comptages de deux dilutions successives sont retenus : appliquer la formule suivante :

$$\frac{\sum c}{(n_1 + 0{,}1n_2)\, d}$$

Où ∑c : somme totale des colonies comptées.

n_1 : nombre de boîtes comptées dans la première dilution.

n_2 : nombre de boîtes comptées dans la seconde dilution.

d : facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus.

Tolérance analytique : 3 m soit $3x10^{3}$

5.2 Microorganismes aérobies à 30° C :

Ce dénombrement est appliqué au beurre concentré.

5.2.1 Milieu : utiliser le milieu dit « Plate Count Agar » additionné de lait.

5.2.2 Ensemencement : déposer en double dans des boîtes de Pétri 1 ml de la phase aqueuse dilution primaire et éventuellement 1 ml de la dilution 10^{-1} Couler 12 à 15 ml de milieu, puis mélanger soigneusement l'inoculum avec le milieu. Laisser refroidir et après solidification, mettre à incuber à 30° C pendant 72 h.

5.2.3 Lecture des boîtes :

Retenir pour comptage les boîtes contenant entre 10 et 300 colonies. Dénombrer toutes les colonies en utilisant si nécessaire une loupe d'un grossissement de 1,5 au maximum.

5.2.4 Expression des résultats :

Calculer le nombre de micro-organismes aérobies par millilitre de dilution primaire, c'est à dire par gramme de beurre concentré (5.1.4).

Tolérance analytique : 3 m soit $1,510^{-3}$

5.3 Bactéries coliformes à 30° C

5.3.1 Milieu : gélose au désoxycholate

Composition :

Protéose peptone.....10 g
Lactose.....10 g
Désoxycholate de sodium.....0,5 g
Chlorure de sodium.....5 g
Citrate de sodium.....2 g
Agar.....15 g
Rouge - neutre.....0,03 g
Eau distillée.....1000 ml

Préparer le milieu juste avant l'emploi : ne pas stériliser.

5.3.2 Ensemencement

Déposer en double dans des boîtes de Pétri, 1 ml de la phase aqueuse, dilution primaire et éventuellement 1 ml de la dilution 10^{-1}. Couler le milieu à raison de 15 ml environ. Mélanger soigneusement l'inoculum avec le milieu. Laisser refroidir puis couler une seconde couche avec 4 ml à 5 ml de milieu non ensemencé. Après solidification, mettre en incubation à 30 °C pendant 22 h à 24 heures.

5.3.3 Lecture des boîtes

Retenir pour comptage les boîtes contenant 150 colonies maximum et dénombrer les colonies rouges typiques d'au moins 0,5 mm de diamètre ; lorsque le diamètre est difficile à estimer, repiquer la colonie dans un tube de bouillon lactosé bilié au vert brillant et porter à l'étuve à 30°C pendant 24 h. à 48 heures afin d'observer la fermentation du lactose.

5.3.4 Expression des résultats

Calculer le nombre de coliformes par millilitre de dilution primaire, C'est-à-dire par gramme de produit selon le mode de calcul décrit en (5.1.4).

Tolérance analytique 3 m pour les beurres pasteurisés et les corps gras à base de matière grasse butyrique soit 30 : absence de tolérance pour le beurre concentré, plan à deux classes.

5.4 Staphylococcus aureus :

5.4.1 Milieu gélose Baird Parker, (E.T.G.P.A).

Couler le milieu complet à raison de 15 ml à 20 ml dans des boîtes de Pétri de 90 mm ou 100 mm de diamètre respectivement.

Après solidification, faire sécher les boîtes retournées, couvercle entrouvert dans une étuve entre 45 °C et 55 °C pendant 30 min. (ou à température ambiante pendant 2 heures). Pour les boîtes de Pétri de 140 mm, couler 28 ml gélose Baird Parker.

Si l'on suspecte la présence de Proteus, il est conseillé d'ajouter une solution de sulfamézathine

Sulfamézathine.....0,2 g
Solution d'hydroxyde de sodium (0,1 mol).....10 ml
Eau qsp.....100 ml

Avant répartition et stérilisation de la gélose Baird Parker, ajouter par litre de milieu 27,5 ml de la solution de sulfamézathine.

5.4.2 Ensemencement

Distribuer 1 ml de la phase aqueuse à la surface de la gélose Baird Parker d'une boîte de Pétri de 140 mm, ou de 3 boîtes de Pétri de 90 mm à 100 mm sous forme de 3 fractions sensiblement égales, puis étaler sans tarder à l'aide d'un étaleur en verre stérile. Laisser imprégner pendant 15 minutes à température ambiante. Mettre à incuber à 37° C pendant 24 h. et 48 heures.

5.4.3 Lecture des boîtes et choix des colonies

Après 24 heures et 48 heures d'incubation, marquer sur les fonds des boîtes les colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques :

Colonies caractéristiques : colonies noires, brillantes convexes, entourées d'une zone transparente qui peut être translucide. Après 24 heures, peut apparaître dans cette zone transparente un anneau opalescent immédiatement au contact des colonies.

Colonies non caractéristiques : colonies noires, brillantes, convexes ou gris noirâtre ayant parfois un aspect mat et une texture sèche, dépourvues de zone transparente (excepté certaines colonies gris noirâtre).

Retenir pour le dénombrement les boîtes qui renferment 150 colonies au maximum, caractéristiques et/ou non caractéristiques. Dénombrer les colonies suivant leur aspect.

Prélever en vue de l'épreuve de la coagulase (éventuellement de la thermonucléase) un nombre de colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques égal à la racine carrée du nombre total des colonies présentes dans une boîte ou trois boîtes de Pétri, en tenant compte de leur nombre respectif.

Lorsque le volume est réparti dans une boîte de Pétri de 140 mm, 5 colonies au minimum doivent être examinées et si leur nombre est inférieur à 5, les prélever toutes ; dans le cas où le volume est réparti sous 3 fractions, 10 colonies au minimum seront examinées et si leur nombre est inférieur, toutes les colonies seront prélevées.

5.4.4 Expression des résultats

Calculer le nombre de staphylococcus aureus par millilitre de dilution primaire, c'est-à-dire par gramme de produit en interprétant les résultats obtenus de la manière suivante :

les résultats douteux à l'épreuve de la coagulase seront considérés comme positifs si l'épreuve de la thermonucléase est positive.

— Si au moins 80 % des colonies examinées sont coagulase positive, considérer que le nombre présumé, donné par le comptage représente le nombre de staphylococcus aureus sinon exprimer le résultat global en tenant compte des proportions de colonies caractéristiques et de colonies non caractéristiques, qui sont coagulase ou thermonucléase positive.

Lorsque plusieurs dilutions ont été examinées, appliquer le mode de calcul décrit en (5.1.4).

Tolérance analytique :

— 3 m pour le beurre cru, les beurres pasteurisés et les corps gras à base de matière grasse butyrique.

— Absence de tolérance pour le beurre concentré, plan à 2 classes.

5.5 Recherche des salmonella

5.5.1 Préenrichissement :

Bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol :

Répartir le bouillon à raison de 1125 ml dans des récipients de 2 litres à large ouverture.

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes

— Enrichissement :

Emploi d'un milieu réparti à raison de 100 ml dans des récipients de capacité appropriée ; le préparer juste avant l'emploi.

- Bouillon au tétrathionate de sodium (Muller et Kauffmann) additionné éventuellement de novobiocine, concentration finale 40 µg/ml de milieu; ne pas stériliser.

— Isolement :

Les géloses sélectives suivantes sont recommandées :

— Gélose au vert brillant et au rouge de phénol (Edel et Kampelmacher)

— Gélose au sulfite de bismuth (Wilson Blair)

— Gélose xylose lysine décarboxylase(XLD) : utiliser les milieux qui autorisent l'ébullition.

— Gélose Hektoen.

Afin d'éviter des effets défavorables au développement des salmonella par certaines géloses sélectives, se conformer aux recommandations suivantes :

les géloses sélectives doivent être utilisées après 24 heures, soit au plus tard dans la journée qui suit leur préparation.

— la stérilisation des milieux doit être évitée.

— les boîtes préparées seront séchées de préférence à température ambiante, par exemple 2 h à 25 °C; les conserver à l'obscurité à la même température ou au réfrigérateur.

5.5.2 Pré-enrichissement (Jour A)

Afin de réduire la charge de travail, prélever depuis chacun des cinq godets de centrifugation contenant la phase aqueuse 25 ml de celle-ci et les rassembler dans un récipient de 2 litres contenant 1125 ml de bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol.

Mélanger soigneusement. Abandonner 1 heure à température ambiante.

Incuber à 37 °C pendant 22 h ± 2 heures.

Lecture après 18 h. à 20 heures ; si le développement est insuffisant, incuber à nouveau pendant 20 h. à 24 heures.

5.5.3 Techniques d'enrichissement et d'isolement

Opérer selon le schéma suivant :

Jour A + 24 h

Enrichissement

par ensemencement de 10 ml de la culture pré- enrichie dans

↓

- 100ml de milieu au tétrationate de sodium incubé au bain marie à 43°C pendant 24 h et 48 h.

↓

Jour A + 48 h Isolement

d'une anse bouclée sur 2 géloses sélectives :

1 - gélose au vert brillant et rouge de phénol ou gélose au bismuth de sulfite

2 - gélose XLD ou gélose Hektoen

Jour A + 72 h

Répéter les isolements tels que décrits à Jour A + 48 h.

Incuber les géloses sélectives à 37° C.

Effectuer une première lecture après 18 h. à 20 heures ; si le développement est insuffisant, incuber à nouveau pendant 20 h. à 24 heures.

5.5.4 Choix des colonies – confirmation

Se référer aux indications données dans la méthode relative à la recherche des salmonella.

5.5.5 Détermination sérologique

Les souches répondant aux caractéristiques biochimiques des Salmonella, ou suspectes, seront soumises à la confirmation sérologique.

5.5.6 Expression des résultats

Lorsque l'échantillon composé est exempt de salmonella, le produit est conforme au critère requis.

Si l'échantillon composé présente des salmonella, il peut être conseillé de réexaminer séparément les 5 unités.

Pour les salmonella, le plan à 2 classes est appliqué sans tolérance analytique.

———★———

Arrêté du 13 Dhou El Hidja 1425 correspondant au 23 janvier 2005 rendant obligatoire une méthode de prélèvement d'échantillons et d'analyse bactériologiques des glaces et crèmes glacées.

Le ministre du commerce ,

Vu le décret présidentiel n ° 04 -138 du 6 Rabie El Aouel 1425 correspondant au 26 avril 2004 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n ° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n ° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 29 Safar 1414 correspondant au 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1 er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n ° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de prélèvement d'échantillons et d'analyse bactériologiques des glaces et crèmes glacées.

Art. 2. — Pour le prélèvement et l'analyse bactériologiques des glaces et des crèmes glacées, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode d'analyse microbiologique décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 13 Dhou El Hidja 1425 correspondant au 23 janvier 2005.

Noureddine BOUKROUH.

ANNEXE

METHODE DE PRELEVEMENT ET D'ANALYSE BACTERIOLOGIQUES DES GLACES ET CREMES GLACEES

1. **PRELEVEMENTS DES GLACES ET CREMES GLACEES**

A. **Matériel à utiliser**

1. **Bocaux de 350 ml** à large ouverture en verre borosilicaté genre pyrex bouchés avec couvercle à vis métallique possédant un intermédiaire qui sera changé à chaque stérilisation. Ces bocaux contiendront des billes de verre genre pyrex. Ils seront préparés et stérilisés au laboratoire.

2. **Caisses glacières**

3. **Matériel de prélèvement**

Cuillères métalliques stériles à long manche; tubes métalliques stériles, genre sonde à fromage mandrin formant piston pénétrant dans le tube.

4. **Lampe à butane (type lampe à souder)**

5. **Neige carbonique ou mélange de glace pilée et de sel**

Ce mélange de glace pilée et de sel sera mis dans des sachets en matière plastique, parfaitement clos.

B. **Technique de prélèvements**

1. **Quantité de produit à prélever** : 100 grammes environ.

2. **Techniques de prélèvements**

Les prélèvements de glaces et crèmes glacées doivent être effectués en prenant toutes les précautions d'asepsie, notamment en ce qui concerne l'ouverture et la fermeture des bocaux.

a) **Glaces et crèmes glacées conditionnées**

— Dans les emballages en papier

Développer le papier et faire glisser la glace dans le bocal sans toucher avec les mains. S'il s'agit de glace sucette, couper le bâtonnet aseptiquement au ras de la glace.

— **Dans les emballages en carton**

Mettre la veille les bocaux à prélèvements dans la caisse glacière, avec les sachets contenant de la glace à rafraîchir. Au moment du prélèvement sortir aseptiquement la crème glacée de l'emballage en carton et la mettre directement dans les bocaux. Remplacer les sachets par de la neige carbonique ou par d'autres sachets contenant le mélange glace plus sel.

b) **Glaces et crèmes glacées servies par le vendeur à la cuillère**

— Utiliser les instruments du vendeur sans les flamber.

c) **Glaces et crèmes glacées vendues au demi-litre ou au litre**

— Utiliser une cuillère métallique flambée.

d) **Glaces et crèmes glacées vendues au moyen d'appareils distributeurs**

— Prendre l'échantillon directement au bec de l'appareil.

e) **Glaces et crèmes glacées surgelées**

— Utiliser le tube métallique formant la sonde. Celui-ci sera flambé très légèrement au moment du prélèvement (ne pas dépasser 50 °C). Avec le mandrin formant piston, pousser la glace pour la mettre dans le bocal.

— Pour l'ouverture et la fermeture des bocaux de prélèvements, les précautions d'usage en matière de bactériologie doivent être prises notamment : ouverture du bocal au dernier moment.

Flambage de l'orifice du bocal et de la partie inférieure du couvercle juste avant l'introduction du prélèvement et au moment de la fermeture du bocal.

II. ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DES GLACES ET CREMES GLACEES

l) **Préparation des échantillons**

a) **Premier procédé**

Les bocaux sortis de la neige carbonique ou de la glace sont mis à l'étuve ou au bain-marie à 37 °C, au maximum pendant 1 heure. Ce temps ne doit pas être dépassé, sinon on aborderait le début de la phase logarithmique de croissance. Dans la pratique, ce réchauffement à 37°C doit être surveillé et arrêté le plus rapidement possible.

Si la glace a été reçue dans la neige carbonique, le laboratoire doit se débarrasser de cette neige carbonique immédiatement, à l'extérieur du laboratoire.

Faire les dilutions jusqu'à 1/100.000 avec une solution de tryptone - sel.

Mais à partir de la dilution au 1/100, on fera une dilution au 1/200 ainsi que la dilution au 1/1000.

b) **Deuxième procédé**

Les produits sont placés dans un réfrigérateur à + 4 °C/ + 6° C jusqu'au moment de la décongélation.

Cette méthode paraît plus favorable que le premier procédé pour les petits échantillons (100 à 200 g) car la décongélation est rapide et ne favorise pas la multiplication des psychrotrophes.

— Après leur décongélation, les glaces sont homogénéisées par une agitation énergique dans le bocal de prélèvement pendant deux à trois minutes, même s'il s'agit de glaces aux fruits et aux amandes.

— Pour les crèmes glacées ou glaces enrobées de chocolat, éliminer l'enrobage à la pince ou au couteau stérilisé et n'examiner que la glace.

— Pour les glaces et crèmes glacées qui foisonnent : détruire la mousse sous vide selon la technique ci-dessous :

Description de l'appareil : Un flacon avec un bouchon percé de 2 trous. Dans un des trous, une pipette Pasteur. L'orifice extérieur de la pipette est obturé par un tampon de coton. Dans l'autre trou, un tube de verre dont l'orifice extérieur est obturé par un tampon de coton et relié au vide.

Le tube où est placé le doigt sert à diminuer ou à augmenter le vide pour éviter le passage de la crème glacée dans le tube relié à la trompe ou à la pompe à vide.

— Manipulation : Boucher la pipette Pasteur avec le doigt. Faire le vide. De temps en temps, laisser passer l'air. Agiter le flacon en même temps. On ne supprime pas toute la mousse, mais c'est une amélioration.

2. **Technique d'examen bactériologique**

A. **Préparation des dilutions**

Faire les dilutions jusqu'à 1/100.000 avec une solution tryptone sel.

Mais à partir de la dilution 1/100 on fera une dilution au 1/200 ainsi que la dilution 1/1000.

Cette dilution au 1/200 servira à dénombrer 200 coliformes par 1 ml.

Formule

Tryptone.....1 g
Chlorure de sodium.....8 g
Eau distillée.....1000 ml
pH : 7 - 7,2

Répartir en tubes ou en flacons. Autoclaver 20 minutes à 120 °C. Vérifier la stérilité du milieu avant de l'employer.

Chaque dilution est agitée soit à la main au moins 30 fois, ou mieux à l'agitateur mécanique, pendant 2 minutes au moins, avant de passer à la dilution suivante. Chaque dilution est effectuée avec une pipette graduée stérile distincte.

B. **Recherches à effectuer**

En tryptone extrait de levures agar pendant 72 h ± 2 heures.

Formule de la tryptone extrait de levures Agar

Tryptone.....6 g
Extrait de levure.....3 g
Agar en poudre.....15 g
Eau distillée.....1000 ml
pH : 7

Répartir en tubes de 20 x 200 mm à raison de 20 ml par tube. Autoclaver 20 minutes à 115° C.

Ensemencer:

1 ml de la dilution au 1/1.000

1 ml de la dilution au 1/10.000

1 ml de la dilution au 1/100.000

0,l ml de la dilution au 1/100.000

Pour faciliter le dénombrement et éviter l'envahissement du milieu par certaines colonies envahissantes utiliser la technique suivante dite des« deux couches » : 1 ml du produit ou des diverses dilutions et porté en boîtes de Pétri.

Le milieu qui a été préalablement fondu et ramené à 45°- 50°C et versé dans la boîte. Ne pas attendre plus de cinq minutes pour couler le milieu. Mélanger. Laisser solidifier sur une surface fraîche et parfaitement horizontale.

Quand la préparation est solidifiée verser en surface une mince couche de gélose blanche (2 mm d'épaisseur environ), préalablement fondue et ramener à 45° C.

Laisser solidifier avant de mettre à l'étuve.

Formule de la gélose blanche

Gélose .....……..20 g

Eau distillée ……...……1000 ml

pH : 7

Répartir en tubes. Autoclaver 20 min. à 120° C.

3. **Dénombrement des bactéries coliformes avec idenification d'Eschérichia Coli**

En bouillon lactosé bilié au vert brillant.

Formule du milieu.

Bactopeptone.....…….…..…..10 g

Lactose.....…….10 g

Eau distillée.....……..786 ml

Bile de bœuf fraîche ou solution à 10% de bile déshydratée...……..…..200 ml

pH : 7,2

Ajouter alors 13,3 ml d'une solution aqueuse à 1/1000 de vert brillant. Répartir en tubes munis d'une cloche (10 ml par tube de l60 x l6 mm) . Stériliser 20 min. à 120° C.

Ensemencer 2 fois.

1 ml de la dilution au 1/10

1 ml de la dilution au 1/100

1 ml de la dilution au 1/200

1 ml de la dilution au 1/1000

Les milieux ensemencés sont mis à l'étuve à 30 °C pendant 48 heures. Les tubes de milieu gazogène sont considérés comme contenant des bactéries coliformes. Les Eschérichia Coli sont identifiés par le test de Mackenzie.

Test de Mackenzie

Pour chaque tube de bouillon lactosé bilié au vert brillant qui contient des gaz à 30° C. on utilise :

— Un tube de bouillon lactose bilié au vert brillant (même formule que ci-dessus).

— Un tube d'eau peptonnée simple dont voici la méthode :

Peptone.....……..……..10 g

Chlorure de sodium.....……..……..5 g

Eau distillée.....……..……..1000 ml

pH : 7,2

— Autoclaver à 121° C pendant 20 minutes.

— Une anse bouclée de chaque tube de bouillon lactosé bilié au vert brillant, gazogène, après agitation soigneuse et inoculée dans un tube de bouillon lactose bilié au vert brillant.

— Une autre anse bouclée du même tube de bouillon lactose bilié au vert brillant, gazogène, après agitation soigneuse et inoculée dans un tube d'eau peptonée simple.

Les deux tubes sont portés au bain-marie à 44 °C± 0,5 pendant 48 heures. Pour conclure à la présence d'Eschérichia Coli, il faut à la fois que le tube de bouillon lactose bilié au vert brillant porté au bain-marie à 44 °C soit gazogène, et que la recherche de l'indole soit positive dans le tube d'eau peptonée simple qui a été porté à 44 °C. La recherche de l'indole s'effectue à l'aide de l'acide nitrique nitreux en présence d'alcool amylique. L'indole se recherche au bout de 24 heures et 48 heures.

4. **Recherche et dénombrement des staphylocoques pathogènes**

Première technique : Sur milieu de Chapman mannité :

Formule du milieu

Bactopeptone.....…….....2 g

Extrait de viande.....…… 1 g

Protéose peptone.....……..9 g

Chlorure de sodium.....75 g

Mannitol.....….10 g

Bacto agar.....…15 g

Rouge de phénol.....…….....….....0,025 g

Eau distillée.....…….....1000 ml

pH final : 7,4 - 7,5

Répartir en tubes de 200 x 22 mm à raison de 25 ml par tube.

Autoclaver 20 min. à 120 ° C. Au moment de l'emploi couler le milieu en boîtes de Pétri. Laisser solidifier.

Faire sécher à l'étuve à 37°C.

Ensemencer sur deux boîtes différentes :

0,l ml du produit non dilué

0,l ml de la dilution au 1/10

Etaler à la surface du milieu d'une façon homogène. Porter à l'étuve à 37 °C. Examiner après 24 heures et 48 heures.

On retiendra les colonies blanches ou jaunes entourées d'un halo jaune (mannitol +).

L'identification des colonies de staphylocoques pathogènes se fera par la mise en évidence de la coagulase libre et éventuellement par la mise en évidence de la phosphatase complétée par la recherche de l'aérobiose anaérobiose. En effet, on peut avoir :

Coagulase + Staphylocoque pathogène
Phosphatase +
Coagulase + Staphylocoque pathogène (6% des cas)
Phosphatase -
Coagulase - Staphylocoque pathogène (4% des cas)
Phosphatase + ou Micrococcus.

Dans ce dernier cas, il faut compléter par la recherche de l'aérobiose anaérobiose, car certains micrococci possèdent une phosphatase. Mais les micrococci sont aérobies stricts. Les staphylocoques sont aérobies anaérobies.

A. Mise en évidence de la coagulase libre

Prélever quelques colonies suspectes. Inoculer chacune d'elles dans un tube de bouillon différent. Porter 24 heures à l'étuve à 37° C.

A partir des cultures en bouillon : Rechercher la coagulase et faire un tube témoin.

Surveiller toutes les heures. Au cas où la coagulase ne serait positive qu'au bout de 24 heures, refaire un examen sur d'autres colonies.

Si la coagulase est négative : Faire la recherche de l'aérobiose anaérobiose.

Rechercher la phosphatase.

Recherche de l'aérobiose anaérobiose :

Prélever de la culture en bouillon avec une pipette Pasteur fermée. L'inoculer sur toute la .hauteur d'un tube de milieu V.L. préalablement fondu, régénérer, et ramener à 48°C - 50° C.

Mettre 24 heures à l'étuve à 37 ° C après refroidissement.

Formule du milieu V.L Milieu à l'extrait de viande et de levure

Peptone trypsique.....10 g
Chlorure de sodium.....5 g
Extrait de viande.....4 g
Extrait de levure.....5 g
Chlorydrate de cystéine.....0,30 g
Glucose.....2 g
Agar en poudre.....6 g
Eau distillée.....1000 ml

Porter à l'ébullition pour dissoudre.

Ajuster à pH 7,2 - 7,4 avec de la lessive de soude au 1/10. Faire bouillir.

Filtrer. Répartir en tubes de 8 ou 9 x 180 mm, sur une hauteur de 8 cm. Stériliser à 115 ° C maximum, pendant 30 minutes.

B. Mise en évidence de la phosphatase

Faire un ensemencement en gélose inclinée à partir de la culture en bouillon. Une anse de la culture en bouillon est étalée sur la surface de la gélose. Porter à l'étuve à 37 ° C pendant 24 heures.

1. Avec la culture obtenue , on fait une forte émulsion du germe, pour cela on met 20 gouttes d'eau salée dans un tube à hémolyse. On porte la culture obtenue en gélose dans cette eau physiologique jusqu'à obtention d'une émulsion dense.

Dans un autre tube à hémolyse contenant 0,25 ml de solution de paranitro phénylphosphate disodique, ajouter 0,25 ml d'une solution d'acétate de sodium. Mélanger le contenu des 2 tubes et incuber à 37°C pendant 20 minutes. Si on a une coloration jaune franc : présence de phosphatase.

Faire en même temps un témoin sans émulsion de staphylocoque.

(solution de paranitrophénylphosphate disodique à 4% dans l'eau distillée).

(solution d'acétate de sodium à 2,025 g dans 250 ml d'eau distillée).

Certains staphylocoques pathogènes peuvent perdre leur coagulase, mais si on a une phosphatage positive et un germe aérobie anaérobie, conclure à staphylocoque pathogène.

2. **Autre technique de mise en évidence de la phosphatase**

Première technique : Mettre 0,50 ml d'eau distillée dans un tube à hémolyse, pulvériser avec un agitateur de verre un comprimé de substrat à l'a-naphtylphosphate acide sodique.
Dans cette suspension faire une émulsion à partir de la culture obtenue sur gélose.

Incuber à 37° C pendant 30 minutes.

Introduire alors un comprimé d'orthodiamine bis azotée préalablement pulvérisé.

En présence de phosphatase on a une coloration rouge grenat produite par l'a-naphtol libéré. Quand la réaction est négative la teinte jaune initiale persiste.

L'identification du caractère pathogène doit porter sur un nombre suffisant de colonies : 5 colonies et plus, s'il y a 50 colonies suspectes sur la boîte; 10 colonies et plus, s'il y a plus de 50 colonies suspectes sur la boîte.

Deuxième technique : Pour la recherche et le dénombrement du staphylocoque pathogène.

Utilisation du milieu de Baird-Parker à la sulfamézathine.

Formule du milieu

a) Milieu de base

Tryptone.....10 g
Extrait de viande de bœuf.....5 g
Extrait de levure.....1 g
Chlorure de lithium.....5 g
Agar.....20 g
Solution de sulfarmézathine à 0,2%.....25 ml
Eau distillée.....1000 ml

Préparation de la solution de sulfamézathine

Dissoudre 0,5 g de sulfamézathine dans 25 ml de soude N/10 et compléter à 250 ml avec de l'eau distillée.

Cette solution peut s'ajouter dans le milieu avant ou après l'autoclavage.

Le milieu de base doit être autoclavé 20 minutes à 120°C.

Le pH final de la base doit être ajusté à 7,2.

Répartir 20 ml par tube de 20 X 200 mm.

Au moment de l'emploi, faire fondre le milieu de base au bain-marie bouillant, puis refroidir à 45°C- 48°C.

Ajouter alors les solutions suivantes, filtrées et chaudes par 20 ml de base.

b) Glycine à 20%.....1,2 ml

c) Tellurite de potassium à 1%.....0,2 ml

d) Pyruvate de sodium à 20%.....1 ml

e) Emulsion de jaune d'œuf.....1 ml

Les solutions b, c et d sont préparées dans de l'eau distillée puis stérilisées par passage sur filtre Seitz ou sur bougie Chamberland L 3.

— Emulsion du jaune d'œuf.

— Diluer 5 ml de jaune d'œuf stérile prélevés aseptiquement dans 95 ml d'eau salée, stérile.

— Vérifier la stérilité par culture en bouillon nutritif ordinaire incuber à 30° C pendant 3 jours au moins.

Le milieu complet ainsi obtenu est coulé en boîtes de Pétri.

Quand le milieu est froid et sec, il est ensemencé avec :

0,1 ml de produit non dilué,0,1 ml de la dilution au 1/10.

Les boîtes inoculées sont incubées à 37 °C et examinées après 24 heures, puis 48 heures.

Les staphylocoques pathogènes forment des colonies noires entourées d'une zone d'éclaircissement du jaune d'œuf.

Cet aspect est caractéristique et spécifique.

Les Proteus Hauseri donnent des colonies identiques, mais la sulfamézathine inhibe leur développement.

Le milieu complet ne se conserve que 24 heures.

Confirmation du caractère pathogène du staphylocoque par la recherche de la phosphatase :

On utilise le réactif nitrophénylphosphate-disodique à 20 gamma par millilitre, en solution dans un tampon pH Tris 8 :

Tampon Tris: triphosphate de sodium pur : 121 g/l .

On verse le réactif à la surface du milieu Baird Parker sur lequel les colonies caractéristiques se sont développées.

On incube à 30° C pendant une demi (1/2) heure.

Les staphylocoques pathogènes, phosphatase + donnent autour de la colonie une coloration jaune qui se trouve à l'intérieur de la zone d'éclaircissement.

On évite ainsi la recherche de la coagulase.

5. Recherche des salmonelles

Effectuer cette recherche sur 25 ml de produit.

a) **Pré-enrichissement.**

25 ml de produit sont portés dans 75 ml de bouillon ordinaire (double concentration).

Formule du bouillon ordinaire (double concentration).

Extrait de viande de bœuf.....2 g
Protéose peptone.....20 g
Chlorure de sodium.....10 g
Eau - distillée.....1000 ml

Répartir dans des flacons de 150 ml, 75 ml du milieu à double concentration. Autoclaver 20 min. à 120 ° C pH 7,2.

Dans un flacon contenant 75 ml de bouillon ordinaire, mettre 25 ml de glace ou de crème glacée. Incuber à 37°C pendant 18 h. à 24 heures.

Le pré-enrichissement en bouillon ordinaire doit être utilisé obligatoirement pour tous les produits surgelés.

b) Enrichissement.

1 ml du contenu de ce flacon est inoculé dans un tube de milieu au sélénite, plus cystine.

Incuber à 37°C, ou mieux à 40°C pendant 24 heures.

Formule du milieu au sélénite plus cystine

Tryptone.....5 g

Lactose.....4 g

Phosphate disodique.....10 g

Sélénite acide de sodium.....4 g

Cystine.....0,01 g

Eau distillée.....1000 ml

PH final 7

Ne pas autoclaver. Répartir à raison de 20 ml par tube de 200 x 20 mm.

Chauffer en vapeur fluente pendant 30 minutes conserver au réfrigérateur.

C. Isolement

L'isolement se fait sur gélose au désoxycholate citrate, lactose, formule de Leifson, modifiée par Hynes.

— On incube à l'étuve à 37°C pendant 24 h. à 48 h.

Les colonies suspectes, quand elles ont été parfaitement isolées, sont repiquées sur milieu de Kligler.

— On procède ensuite à l'identification.

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 21 Chaâbane 1426 correspondant au 25 septembre 2005 rendant obligatoire la méthode de recherche de *Listeria monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 05-161 du 22 Rabie El Aouel 1426 correspondant au 1er mai 2005 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 29 Safar 1414 correspondant au 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de recherche de *Listeria monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers.

Art. 2. — Pour la recherche de *Listeria monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode d'analyse microbiologique décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 21 Chaâbane 1426 correspondant au 25 septembre 2005.

Lachemi DJAABOUBE

ANNEXE

METHODE DE RECHERCHE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DANS LE LAIT ET LES PRODUITS LAITIERS

1. Définitions

Pour les besoins de la présente méthode les définitions suivantes s'appliquent.

1.1 *Listeria spp* :

Microorganismes formant des colonies typiques sur un milieu sélectif solide et possédant les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques décrites quand les essais sont effectués selon la présente méthode.

1. 2 *Listeria monocytogenes* :

Espèce type de *Listeria* pathogène et qui peut être différenciée des autres espèces car elle présente des caractéristiques biochimiques spécifiques.

1.3 Recherche de *Listeria monocytogenes*

Détermination de la présence ou de l'absence de ce microorganisme, dans une masse ou un volume déterminé, quand les essais sont effectués selon la présente méthode.

2. Principe

En général, la recherche de *Listeria monocytogenes*, nécessite au moins quatre étapes successives telles que décrites de (2.1) à (2.4). Et tel qu'illustré également par la représentation schématique du mode opératoire suivant :

Figure 1

Représentation schématique
du mode opératoire

↓

Enrichissement primaire (25 gr ou 25 ml dans 225 ml
de milieu Fraser au 1/2)
Incubation à 30° C pendant 18 à 24 h

↓

Ensemencement secondaire 0,1ml sur Fraser
en tubes de 10 ml, et
Isolement en stries sur gélose Oxford ou Palcam
Incubation à 37° C pendant 24 à 48 h

↓

Sélection de trois à cinq colonies caractéristiques
et isolement en stries sur une autre plaque
de gélose Oxford ou Palcam
Incubation à 37° C pendant 24 à 48 h

↓

Purification sur gélose TSYEA

↓

Incubation à 37° C pendant 24 h
(ou plus, si nécessaire)

↓

Examens complémentaires

2.1 Enrichissement primaire en milieu sélectif liquide

Prise d'essai de 25 gr ou 25 ml d'échantillon dans le milieu sélectif Fraser au demi. Incubation à 30° C pendant 18 à 24 h

2.2 Enrichissement secondaire et isolement primaire.

Après la période d'incubation du milieu (2.1) procéder :
* d'une part, à l'enrichissement secondaire dans du bouillon Fraser en tubes à raison de 0,1 ml de la solution obtenue en (2.1), à incuber à 37°C pendant 24h,

* et d'autre part, à l'isolement primaire par stries sur une plaque de gélose Oxford ou Palcam. L'incubation se fera à 37°C pendant 24 à 48 heures.

2.3 Confirmation

Après la période d'incubation des milieux (2.2) procéder :

* d'une part, à l'isolement secondaire par stries sur une plaque de gélose Oxford ou Palcam, à partir du bouillon d'enrichissement secondaire. L'incubation se fera à 37°C pendant 24 à 48 heures,

* et d'autre part, à la lecture des plaques de gélose Oxford ou Palcam. Observer les colonies caractéristiques, et repiquer trois à cinq d'entre elles sur milieu TSYEA en vue d'une purification. L'incubation des plaques de gélose TSYEA se fera à 37°C pendant 24 à 48 heures.

2.4 Identification biochimique

Après la période d'incubation, procéder d'abord :

* à l'identification du genre *Listeria* basée sur l'aspect morphologique des colonies, la coloration de Gram et sur la réaction Catalase,

* puis à l'identification de l'espèce *Listeria monocytogenes*, basée essentiellement sur l'hydrolyse de l'esculine, la mobilité à 22-25°C, les réactions (Vauges Prauskawer VP) et du rouge de méthyle, l'hémolyse ou le Camp-Test, la fermentation du glucose sans gaz, le type respiratoire.

3. Milieux de culture et réactifs

3. 1 Milieux de culture

3.1.1 Bouillon d'enrichissement primaire : milieu de base.

Composition :

Peptone de protéase……..……...	5,0 g
Tryptone ……..……	5,0 g
Extrait de viande de bœuf ……..….	5,0 g
Extrait de levure ……..……	5,0 g
NaCl …….…….….....	20,0 g
$Na_2HPO_4 2H_2O$ …….……..	12,0 g
KH_2PO_4 …….……..	1,35 g
Esculine ……..……	1,0 g
Chlorure de lithium …….……	3,0 g
Eau…….….....	1000ml

Préparation :

Faire dissoudre les composants dans de l'eau, puis chauffer modérément jusqu'à dissolution complète. Ajuster le pH à 7,2.

Répartir ensuite le milieu à raison de :

— 225 ml par flacon qui serviront aux enrichissements primaires ;

— 10 ml par tube qui serviront aux enrichissements secondaires.

Stériliser ensuite le milieu à 121°C pendant 15 minutes.

3.1.2 **Supplément sélectif pour Bouillon Fraser**

Au moment de l'utilisation du bouillon Fraser au demi tout comme le bouillon Fraser, ils doivent être additionnés de leur supplément dont la formule est la suivante :

Acide nalidixique ……..... 22,5 mg

Acriflavine ……..…… 28,125 mg

Citrate de Fer (III) ammoniacal ……..……..… 1,125 mg

Reconstituer stérilement un flacon de supplément par 22,5 ml d'un mélange 1/1 eau/éthanol stérile (soit 11,25 ml d'eau distillée stérile et 11,25 ml d'éthanol).

Mélanger doucement pour dissoudre.

Ajouter ensuite aseptiquement :

* 2,25 ml de la solution ainsi préparée, à 225 ml de bouillon Fraser au demi ;

* 0,10 ml de la solution ainsi préparée, à 10 ml de bouillon Fraser.

Bien mélanger avant d'introduire l'inoculum.

Une fois reconstitué, le supplément doit être maintenu à + 4°C, à l'abri de la lumière et ne doit pas dépasser les 8 jours.

3.1.3. **Milieu d'isolement (gélose Oxford) milieu de base**

Composition :

Gélose Columbia.....……...……..……39 g
Esculine.....……....1 g
Citrate de fer(3+) ammoniacal...……..…..……..0,5 g
Chlorure de lithium.…….....…….....15 g
Eau…….....……....1000 ml

Préparation

Dissoudre les composants dans de l'eau, puis chauffer modérément jusqu'à dissolution complète. Ajuster le pH à 7,2 à 25°C. Répartir ensuite le milieu à raison de 225 ml par flacon puis stériliser à 121°C pendant 15 minutes.

3.1.4 **Supplément sélectif pour gélose Oxford.**

Composition :

Cycloheximide ..... 200 mg
Sulfate de colistine.....……...10 mg
Acriflavine.....…..……...……...2,5 mg
Céfotétan.....……....1 mg
Fosphomycine.....……....…..….5 mg
Ethanol.....……....……2,5 ml
Eau.....……..……2,5 ml

Préparation :

Dissoudre les ingrédients solides dans le mélange éthanol/ eau. Stériliser par filtration.

Au moment de l'emploi faire fondre le milieu puis le refroidir à une température de l'ordre de 48°C. Ajouter par la suite 2,25 ml du supplément sélectif Oxford reconstitué.

Homogénéiser et couler en boîtes de Pétri stériles.

Laisser solidifier sur paillasse puis les sécher à l'étuve.

Les boîtes ainsi préparées peuvent également être conservées à +4°C pendant 4 à 5 jours.

3.1.5. **Milieu d'isolement (gélose Palcam) milieu de base**

Composition :

Peptone ..... 23,0 g
Amidon ..... 1,0 g
Agar - Agar ..... 20,0 g
Chlorure de sodium ..... 5,0 g
D(-) mannitol ..... 10,0 g
Ammonium de fer III citrate ..... 0,5 g
Esculine ..... 0,8 g
Glucose ..... 0,5 g
Chlorure de lithium ..... 15,0 g
Rouge de Phénol ..... 0,08 g
Eau ..... 1000 ml

Dissoudre les composants dans de l'eau, puis chauffer modérément jusqu'à dissolution complète. Ajuster le pH à 7,2 à 25°C. Répartir ensuite le milieu à raison de 225 ml par flacon puis stériliser à 121°C pendant 15 minutes.

Préparation :

Au moment de l'emploi faire fondre le milieu puis le refroidir à une température de l'ordre de 48°C. Ajouter par la suite 2,25 ml du supplément Palcam reconstitué.

Homogénéiser et couler en boîtes de Pétri stériles.

Laisser solidifier sur paillasse puis les sécher à l'étuve.

Les boîtes ainsi préparées peuvent également être conservées à +4°C pendant 4 à 5 jours.

3.1.6 **Milieu de culture gélosé : Tryptone soja extrait de levure (TSYEA)**

Composition :

Bouillon tryptone soja ..... 30,0 g
Extrait de levure ..... 6,0 g
Agar Agar (1) ..... 9 à 18,0 g
Eau ..... 1000 ml
Digestat enzymatique de caseïne ..... 17,0 g
Digestat enzymatique de farine de soja ..... 3,0 g
Chlorure de sodium ..... 5,0 g
Hydrogénophosphate dipotassique ..... 2,5 g
Glucose ..... 2,5 g

Dissoudre les composants dans de l'eau, puis chauffer modérément jusqu'à dissolution complète. Ajuster le pH à 7,3 à 25°C. Répartir ensuite le milieu à raison de 225 ml par flacon puis stériliser à 121°C pendant 15 minutes.

Au moment de l'emploi, faire fondre le milieu puis le refroidir à une température de l'ordre de 48°C. Couler en boîtes de Pétri, laisser solidifier sur paillasse puis les sécher à l'étuve.

Les boîtes ainsi préparées peuvent également être conservées à +4°C pendant 4 à 5 jours.

(1) selon le pouvoir gélifiant de l'Agar-Agar

3.1.7 **Gélose au sang**

Base de gélose au sang n° 2 (1)..... 40 g
Eau ……..... 1000 ml

Composition :

Peptone de protéose ..... 15 g
Digestat de foie ..... 2,5 g
Extrait de levure ..... 5 g
Chlorure de sodium ..... 5 g
Agar-Agar (selon le pouvoir gélifiant de l'agar) 12 à 18 g

Préparation

— Dissoudre la base de gélose au sang déshydratée dans l'eau, en portant à ébullition.

— Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,0 à 25° C.

— Répartir la base dans des flacons de 500 ml de capacité maximale.

— Stériliser à l'autoclave (4.1.1.2) réglé à 121° C pendant 15 minutes.

— Refroidir le milieu à 45° C. Ajouter le sang défibriné et bien mélanger.

— Répartir le milieu par quantités d'environ 20 ml dans des boîtes de Pétri stériles et le laisser se solidifier.

3.1.8. **Base**

Protéose peptone ..... 10 g
Extrait de bœuf ..... 1 g
Chlorure de sodium ..... 5 g
Pourpre de bromocrésol ..... 0,02 g
Eau ..... 1000 ml

3.1.8.1 **Préparation**

— Dissoudre les composants dans l'eau en portant à ébullition.

— Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 6,8 à 25° C.

— Répartir dans des tubes par quantités telles qu'après il reste 9 ml.

— Stériliser à l'autoclave (4.1.1.2) réglé à 121°C pendant 20 minutes.

3.1.8.2 **Solutions d'hydrates de carbone**

Composition :

Hydrate de carbone (2) ..... 5 g
Eau ..... 100 ml

Préparation

Dissoudre séparément chaque hydrate de carbone.

3.1.8.3 **Milieu complet**

Pour chacun des hydrates de carbone, ajouter aseptiquement 1 ml de solution (3.1.8.2) à 9 ml milieu de base (3.1.8.1).

Si de plus petits volumes de milieu de base ont été préparés, ajouter alors également de plus petits volumes de solution d'hydrate de carbone.

(1) Composition de la base de gélose au sang n° 2.

(2) 100 ml de solution de L-raminose et 100 ml de solution de D-xylose sont nécessaires.

3.1.9 **Milieu de mobilité**

Composition :

Peptone de caséine ..... 20,0 g
Peptone de viande ..... 6,1 g
Agar-agar ..... 3,5 g
Eau ..... 1000 ml

Préparation

— Dissoudre les composants dans l'eau en portant à ébullition.

— Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,3 à 25° C.

— Répartir dans des tubes par quantités d'environ 5 ml.

— Stériliser à l'autoclave (4.1.1.2) réglé à 121°C pendant 15 minutes.

3.1.10 Essai de CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen)

Les boîtes de gélose au sang (3.1.7) peuvent convenir pour cet essai, mais il est préférable d'utiliser des boîtes de Pétri à très minces couches de gélose au sang de mouton (3.1.10.3).

3.1.10.1 Base

Composition :

Base de gélose au sang n° 2 (voir 3.1.7) ..... 40 g
Eau ..... 1000 ml

Préparation

— Dissoudre la base déshydratée dans l'eau en portant à ébullition.

— Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 à 25° C.

— Répartir dans des tubes ou des flacons par quantités de 100 ml.

— Stériliser l'autoclave (4.1.1.2) réglé à 121° C pendant 15 min. Laisser refroidir à 45° C.

3.1.10.2 Milieu au sang

Composition :

Couche de base (3.1.10.1) ..... 100 ml
Sang défibriné de cheval ou de mouton ..... 7 ml

Préparation

Ajouter le sang défibriné à la base fondue et stérilisée (3.1.10.1).

3.1.10.3 Milieu complet

— Répartir la base (3.1.8.1) dans des boîtes de Pétri stériles par quantités d'environ 10 ml et laisser se solidifier. Verser une très fine couche du milieu de sang (3.1.10.2) en utilisant des quantités n'excédant pas 3 ml par boite.

— Laisser se solidifier en une pellicule uniforme. Si le sang est ajouté à des boîtes contenant la base préparée à l'avance, il peut s'avérer nécessaire de chauffer les boîtes pendant 20 min. en les plaçant dans une étuve réglée à 37°C avant de verser la pellicule de sang.

— Sécher les boîtes avant l'emploi.

3.1.10.4 Cultures de réaction CAMP

Une souche faiblement β-hémolytique de *Staphylococcus aureus* (par exemple, NCTC 1803) et une souche de *Rhodococcus equi* (par exemple, NCTC 1621) sont nécessaires pour réaliser l'essai de CAMP. Toutes les souches de *Staphylococcus aureus* ne se prêtent pas à l'essai de CAMP.

— Conserver les cultures de *S. aureus, R. equi, L. monocytogenes, L. innocua et L. ivanovii* en ensemençant les tubes inclinés de TSYEA (3.1.6), et en incubant à 37° C pendant 24 h à 48 h, ou jusqu'à ce qu'une croissance se produise, et les conserver au réfrigérateur (4.1.10) à 4° C.

— Repiquer les cultures au moins 1 fois par mois.

3.2 Réactif-Solution de péroxyde d'hydrogène, 3% (V/V)

4. Appareillage et verrerie

Stériliser tous les appareils qui entreront en contact avec les milieux de culture, le liquide de dilution ou l'échantillon, sauf s'il s'agit d'appareils livrés en condition stérile (en particulier les appareils en matière plastique).

4.1 Appareillage

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et, en particulier, ce qui suit.

4.1.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave).

4.1.1.1 Four, réglable à 173° C ± 3.

4.1.1.2 Autoclave, réglable à 121° C ± 1.

4.1.2. Etuve, réglable à 30° C ± 1.

4.1.3 Etuve, réglable à 37°C ± 1.

4.1.4 Etuve, réglable à 25° C ± 1.

4.1.5 Bains d'eau, réglables à 45° C ± 1 ou à 37° C ± 1.

4.1.6 Appareillage pour l'homogénéisation

Utiliser l'un des appareils suivants :

a) homogénéisateur rotatif, dont la fréquence de rotation est comprise entre 8000 tours/ min et 45000 tours/ min, avec des bols en verre ou en métal, munis de couvercles résistant aux conditions de stérilisation; ou

b) homogénéisateur de type péristaltique (stomacher), avec des sacs stériles en matière plastique.

Les bols ou les sacs en matière plastique doivent avoir une capacité suffisante pour permettre de mélanger correctement la prise d'essai avec la quantité appropriée de diluant. En général, le volume du récipient doit être environ le double du volume de la prise d'essai additionnée du diluant.

4.1.7 Anses bouclées, en platine/iridié ou en nickel-chrome, ou en matière plastique, d'environ 3 mm de diamètre.

4.1.8 Fil d'ensemencement, en platine/iridié, en nickel-chrome ou en matière plastique.

4.1.9 pH-mètre à température compensée pour mesurer le pH des milieux préparés et des réactifs, précis à ± 0,l unité de pH à 25° C.

4.1.10 Réfrigérateur pour conserver les milieux préparés et les réactifs, pouvant fonctionner à une température comprise entre +2° C et +5° C.

4.1.11 Faisceau de lumière blanche

4.1.12 Miroir, plat ou concave.

4.1.13 Trépied, pour éclairer les boîtes de Pétri.

4.1.14 Microscope à contraste de phase, avec objectif à immersion à l'huile.

4.2 Verrerie

La verrerie doit résister à des stérilisations répétées.

4.2.1 Flacons de culture, pour la stérilisation et la conservation de milieux de culture et l'incubation de milieux liquides.

4.2.2 Tubes de culture, de 16 mm de diamètre et125 mm de longueur. (Des tubes à couvercle métallique peuvent être utilisés).

4.2.3 Eprouvettes graduées, pour la préparation des milieux complets.

4.2.4 Pipettes graduées, de 25 ml, 10 ml et 1 ml de capacité, graduées respectivement en 0,5 ml, 0,5 ml et 0,l ml.

4.2.5 **Boîtes de Pétri stériles.**

4.2.6 **Lames** pour microscope.

4.2.7 **Billes en verre.**

5. Echantillonnage

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

Il convient de suivre les instructions pour l'échantillonnage à des fins microbiologiques.

6. Préparation de l'échantillon

6.1 Lait

Agiter soigneusement l'échantillon afin d'assurer une répartition aussi uniforme que possible des microorganismes, en retournant rapidement 25 fois le récipient contenant l'échantillon. Il faut éviter la formation de mousse ou bien la laisser se disperser si elle se forme. L'intervalle de temps entre le mélange et le prélèvement de la prise d'essai ne doit pas dépasser 3 min.

6.2 Lait sec, poudre de lactosérum, babeurre en poudre, lactose, caséine, caséinate

Mélanger soigneusement le contenu du récipient fermé en secouant et en retournant manuellement de façon répétée. Si le récipient est trop rempli pour permettre une bonne agitation, transférer dans un récipient plus grand, puis mélanger.

6.3 Beurre

Faire fondre l'échantillon dans un récipient stérile dans un bain d'eau (4.1.5) maintenu à 45° C. Agiter pendant la fusion et retirer immédiatement le récipient du bain d'eau dès que l'échantillon est juste fondu.

6.4 Fromage

Normalement, l'échantillon pour laboratoire peut être composé de la pâte et de la croûte. Les portions du fromage constituant l'échantillon pour essai devront faire l'objet d'un accord entre les parties intéressées concernées.

Opérer comme décrit au point (7.1.5).

6.5 Glaces de consommation

Procéder comme dans le cas du beurre (6.3) mais utiliser un bain d'eau (4.1.5) maintenu à une température inférieure à 37° C, ne doit pas dépasser cette température.

6.6 Laits fermentés, yaourts, crèmes desserts

Mélanger le contenu du récipient fermé en secouant et en retournant manuellement de façon répétée, ou ouvrir le récipient et mélanger le contenu aseptiquement en utilisant une spatule ou une cuillère stérile.

7. Mode opératoire

7.1 Ensemencement du milieu d'enrichissement

Pour examiner plus d'une prise d'essai de 25 g d'un lot spécifié de lait ou de produit laitier et que l'on peut prouver que le groupement (mise en commun des diverses prises d'essai) n'affectera pas le résultat pour le lait ou les produits laitiers, les prises d'essai peuvent être regroupées. Par exemple, s'il faut examiner 10 prises d'essai de 25 g, on pourra regrouper les 10 unités pour former une seule prise d'essai de 250 g et la dissoudre ou la mélanger dans 2,25 l de milieu d'enrichissement.

Ajouter une prise d'essai au milieu d'enrichissement (3.1.1) comme décrit de (7.1.1) à (7.1.7).

7.1.1 Lait

Ajouter 25 ml de la prise d'essai à 225 ml de milieu d'enrichissement (3.1.1) et mélanger.

7.1.2 Lait sec, poudre de lactosérum, babeurre en poudre et caséinate

Peser aseptiquement 25 g de l'échantillon pour essai dans un flacon bouché contenant 225 ml de milieu d'enrichissement (3.1.1). Dissoudre en agitant.

7.l.3 Caséine

— Peser aseptiquement 25 g de l'échantillon pour essai dans le récipient stérile de l'homogénéisateur (4.l.6) et ajouter 225 ml de milieu d'enrichissement (3.1.1) à 45° C.

— Dissoudre soigneusement la prise d'essai par homogénéisation (1 min à 3 minutes).

7.l.4 Beurre

Agiter l'échantillon pour essai fondu, puis à l'aide d'une pipette chauffée à environ 45°C, transférer 25 ml dans un flacon contenant 225 ml de milieu d'enrichissement (3.1.1). Mélanger soigneusement.

7.1.5 Fromage

— Peser 25 g de l'échantillon pour essai dans le récipient stérile de l'homogénéisateur,(4.1.6).

— Ajouter 225 ml de milieu d'enrichissement (3.1.1) préchauffé à 37° C environ. Mélanger soigneusement la prise d'essai par homogénéisation.

7.1.6 Produits laitiers congelés (y compris les glaces de consommation)

Transférer 25 g de l'échantillon pour essai fondu à l'aide d'une pipette dans un flacon contenant 225 ml de milieu d'enrichissement (2.1) et mélanger.

7.1.7 Laits fermentés, yaourts, crèmes et desserts

— Peser aseptiquement 25 g de l'échantillon pour essai dans un flacon bouché et contenant des billes en verre (4.2.7) et 225 ml de milieu d'enrichissement (3.1.1).

— Mélanger en agitant.

Si l'on examine des échantillons à basse valeur de pH, vérifier aseptiquement le pH de la suspension avec un papier indicateur coloré et, si nécessaire, l'ajuster à 7,0 ± 0,5 à 25° C.

7.2 Incubation

Incuber le milieu d'enrichissement ensemencé pendant 48 h dans l'étuve (4.1.2) réglée à 30° C.

7.3 Isolement et identification présumée

7.3.1 Ensemencer en stries avec une anse (4.1.7) à partir du milieu d'enrichissement la surface d'une boîte de gélose d'Oxford (3.1.3) pour obtenir des colonies bien isolées.

7.3.2 Retourner la boîte et la placer dans l'étuve (4.1.3) réglée à 37° C pendant 48 h.

7.3.3 Examiner la boîte pour vérifier la présence de colonies typiques de *Listeria spp.* (colonies entourées par des halos bruns foncés ou noirs).

7.4 Confirmation

7.4.1 Sélection de colonies pour confirmation

A partir de chaque boîte de milieu d'isolement (gélose d'Oxford),(3.1.3), sélectionner cinq colonies typiques ou suspectes ou, s'il y a moins de cinq colonies, sélectionner toutes les colonies pour confirmation.

7.4.2 Incubation

Ensemencer en stries les colonies sélectionnées sur la surface des boîtes par (TSYEA) (7.3.2) d'une façon permettant aux colonies bien isolées de se développer. Placer les boîtes dans l'étuve (4.1.3) réglée à 37° C pendant 24 h ou jusqu'à ce que la croissance soit satisfaisante.

L'épaisseur du milieu de gélose (15 ml/boîte) est importante pour une bonne illumination de Henry (voir ci-dessous).

Examiner les boîtes à l'aide d'un faisceau de lumière blanche (4.1.11), suffisamment puissante pour bien éclairer les boîtes et orienté de façon à éclairer le fond de la boîte sous un angle de 45° (voir figure 2).

Lorsqu'on examine sous cette lumière en éclairage oblique (illumination de Henry) en regardant le dessus de la boîte, les colonies de *Listeria spp.* sont de couleur bleue, et présentent une surface granuleuse.

Si les boîtes (TSYEA) ne présentent pas de grandes colonies typiques bien isolées, il convient d'ensemencer à nouveau en stries une colonie et de procéder comme décrit précédemment.

7.4.3 Réaction par catalase

Prélever une colonie typique et la mettre en suspension dans une goutte de solution de péroxyde d'hydrogène à 3% (3.2) sur une lame.

La présence de *Listeria* spp. positives par catalase est démontrée par la formation de bulles de gaz.

7.4.4 Morphologie et propriétés de coloration

7.4.4.1 Préparer une culture dans le milieu (TSYEA) (3.1.6)correspondant à une colonie typique utilisée dans la réaction hémolytique (7.4.5).

Choisir une colonie typique et la mettre en suspension dans un tube contenant du TSYEA. Incuber dans l'étuve (4.1.4) réglée entre 20° C et 25° C jusqu'à l'apparition d'un trouble important (entre 8 h et 24 h).

Examen des boîtes pour déceler des colonies suspectes

Réaliser une préparation humide en utilisant une anse remplie de culture incubée et l'examiner au microscope (4.1.4). *Les Listeria spp.* se présentent sous forme de minces bâtonnets courts ayant une mobilité lente en pirouette.

Des cultures développées à une température supérieure à 25° C peuvent ne pas présenter cette mobilité. Il faut toujours comparer avec une culture connue. Les *cocci*, les grands bâtonnets ou les bâtonnets présentant une mobilité rapide ne sont pas des *Listeria* spp.

Un essai complémentaire de contrôle de la mobilité peut être effectué en ensemençant, avec un fil à ensemencement (4.l.8), le milieu de mobilité (3.1.9) par piqûres avec une culture prélevée à partir d'une colonie typique de (TSYEA) (7.4.2) et incuber dans l'étuve (4.1.4) réglée à 25° C pendant 48 h.

— Examiner la croissance autour des piqûres. Les *Listeria spp.* sont mobiles et produisent un motif de croissance typique en ombrelle.

En cas de résultat négatif, incuber pendant 5 jours supplémentaires et observer à nouveau les piqûres.

7.4.4.2 Effectuer un essai sur une colonie typique sur (TSYEA) (7.4.2) pour la réaction de Gram. *Les Listeria* spp. sont des germes Gram positif.

7.4.5 Hémolyse

— Si les caractéristiques morphologiques et physiologiques et la réaction par catalase indiquent la présence de *Listeria spp.*, ensemencer les boîtes de gélose au sang (3.1.7) pour déterminer la réaction hémolytique.

— Bien sécher la surface de gélose avant l'utilisation. Tracer une grille sur le fond de la boîte pour définir une trame de 20 à 25 espaces par boîte.

— Prendre une colonie typique à partir de la boîte (TSYEA) et inoculer un espace pour chaque culture à l'aide d'un fil d'ensemencement (4.1.8).

— Piquer simultanément des cultures de contrôle positives et négatives (*L. monocytogenes, L. ivanovii* et L. *innocua*).

Après incubation à 37° C pendant 48 h dans l'étuve (4.1.3), examiner les souches d'essai et les cultures de contrôle.

— Les L. *monocytogenes* présentent des zones claires étroites et légères (l-hémolyse); les L. *innocua* ne doivent présenter aucune zone claire autour du point de piqûre.

— Les L. *ivanovii* présentent habituellement des zones larges et bien délimitées de fi-hémolyse. Maintenir les boîtes sous une lumière vive pour comparer les cultures en essai avec des cultures de contrôle.

7.4.6 Confirmation biochimique

Pour ces essais, utiliser une culture dans du TSYEA (7.4.4.1).

7.4.6.1 Utilisation d'hydrate de carbone

— Ensemencer chacun des bouillons de fermentation d'hydrate de carbone (3.1.8.2) avec le contenu d'une anse ou 0,l ml de culture (TSYEA) (7.4.6).

— Incuber à 37° C dans l'étuve (4.l.3) pendant 7 jours.

Toutefois, les réactions positives (formation d'acide) sont révélées par une coloration jaune et se produisent généralement dans un délai de 24 h à 48 h.

7.4.6.2 Essai de CAMP

Ensemencer en stries les cultures de *S. aureus* et *R. equi* en lignes simples en travers de la boîte de gélose au sang (3.1.7 ou 3.1.10) de telle sorte que les 2 cultures soient parallèles et diamétralement opposées (voir figure 3).

Il est nécessaire d'avoir un inoculum fin et égal. Ceci peut être obtenu en utilisant une aiguille d'ensemencement (4.1.8) ou une anse (4.1.7) maintenue à angle droit par rapport à la gélose.

Ensemencer en stries la souche d'essai de façon similaire à angle droit par rapport à ces cultures de telle sorte que la culture d'essai et les cultures de réaction ne se touchent pas mais soient distantes d'environ 1 mm à 2 mm en leur écart le plus proche.

Plusieurs souches d'essai peuvent être ensemencées en stries sur la même boîte.

— Simultanément, ensemencer en stries les cultures de contrôle de *L. monocytogenes, L. innocua* et *L. ivanovii.* Si la gélose au sang (3.1.7) est utilisée incuber les boites à 37° C pendant 18 h à 24 h, dans l'étuve (4.1.3). Si des boites à double souches sont utilisées incuber à 37°C pendant 12 h à 18 h, dans l'étuve (4.1.3).

Considérer la réaction comme positive s'il y a une zone développée de fi-hémolyse à l'intersection de la souche d'essai et de la culture de *S. aureus* une réaction positive.

La réaction positive avec R. *equi* se traduit par la présence d'une large «tête de flèche» (5 mm à 10 mm) d'hémolyse.

Ceci se traduit par une petite zone arrondie d'hémolyse développée, s'étendant seulement sur environ 2 mm à partir de la souche d'essai et à l'intérieur de la zone faiblement hémolytique due à la croissance de la culture de *S. aureus.* Une réaction similaire peut être observée à l'intérieur de la culture d'essai avec *R. equi*, mais elle est considérée comme négative.

Il n'apparaît pas de grandes zones d'hémolyse autour de la culture *S. aureus.*

7.5 Interprétation des propriétés morphologiques et physiologiques et de la réaction biochimique

(voir tableau 1)

— Toutes les *Listeria* spp. se présentent sous forme de petits bâtonnets Gram positifs (uniquement avec les cultures de 24h) qui présentent une mobilité à l'état frais et dans le milieu de mobilité.

— Elles sont positives à la catalase. *Les L. monocytogenes* utilisent la rhamnose mais pas la xylose.

— Les *L. monocytogenes, L. ivanovii* et *L. seeligeri* (réaction faible) produisent une a-hémolyse dans les ensemencements sur la gélose au sang.

Retirer la colonie pour examiner l'hémolyse en dessous de la colonie. Sur les trois *Listeria spp.* hémolytiques, seule la *L. monocytogenes* n'utilise pas la xylose et s'avère positive pour ce qui concerne l'utilisation de rhamnose.

— *L. monocytogenes* et *L. seetigeri* (réactions faibles) présentent une réaction positive à l'essai de CAMP avec S. aureus mais pas avec R. equi.

— *L. ivanovii* réagi avec *R. equi* mais pas avec *S. aureus.* Les autres Listeria spp. présentent des réactions négatives à l'essai de CAMP avec les deux cultures de réaction.

7.6 Confirmation définitive

Les souches qui sont considérées comme étant des *Listeria spp.* (7.5) peuvent être confirmées par une identification définitive.

— Avec le lait cru, il a parfois été observé, qu'en procédant à un repiquage du bouillon d'enrichissement après incubation pendant 24 h et 48 h, on pouvait améliorer la sensibilité de la méthode.

— On a observé que la méthode est moins sensible pour certains fromages à croûte lavée et certains fromages persillés que pour d'autres produits (ainsi, la sensibilité de la méthode pour le fromage Limburger est plus faible à des concentrations de *L. monocytogenes* inférieures à deux par gramme environ). Pour certains types de fromages, l'incubation du bouillon d'enrichissement doit être étendue à 7 jours.

Lorsque le bouillon d'enrichissement a été incubé pendant 48 h, puis après 7 jours, il convient d'ensemencer les boîtes de milieu d'isolement.

— Il est possible d'utiliser la méthode pour la détection de *L. moncytogenes* dans des échantillons prélevés sur les sites de production. Toutefois, aucun essai en commun n'a encore été entrepris pour savoir si cet organisme est retrouvé dans ces échantillons.

7.7 Cultures de contrôle

Afin de s'assurer que les milieux d'enrichissement et d'identification sont capables de permettre la croissance des *L. monocytogenes,* introduire une dilution de la culture de référence de souches récemment isolées, dans un flacon de contrôle du milieu d'enrichissement (voir 7-2). Ajouter 10 à 100 cellules de *L. monocytogenes* par flacon.

Procéder avec les flacons de contrôle de la même façon qu'avec les cultures d'essai pour démontrer que la culture de contrôle positive est retrouvée.

8. Expression des résultats

Selon l'interprétation des résultats qui a été faite signaler la présence ou l'absence de *L. monocytogenes* dans la prise d'essai, en spécifiant la masse en grammes ou le volume en millilitres de l'échantillon soumis à l'essai.

9. Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode selon laquelle l'échantillonnage a été effectué, si elle est connue, la méthode utilisée, le résultat d'essai obtenu, et si la répétabilité a été vérifiée, le résultat final cité qui a été obtenu.

Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente méthode, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur le résultat d'essai.

Le rapport d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

Tableau 1 – Réaction pour l'identification de *Listeria* spp

Espèce	Production d'acide		Essai de CAMP	
	Raminose	Xylose	S. aureus	R. équi
L. monocytogènes	+	—	+	—
L. innocua	V	—	—	—
L. ivanovii	—	+	—	+
L. seeligeri	—	+	(+)	—
L. welshimeri	V	+	—	—
L. grayi	—	—	—	—
L. murrayi	V	—	—	—

V = réaction variable
(+) = réaction faible
+ = réaction positive
— = pas de réaction

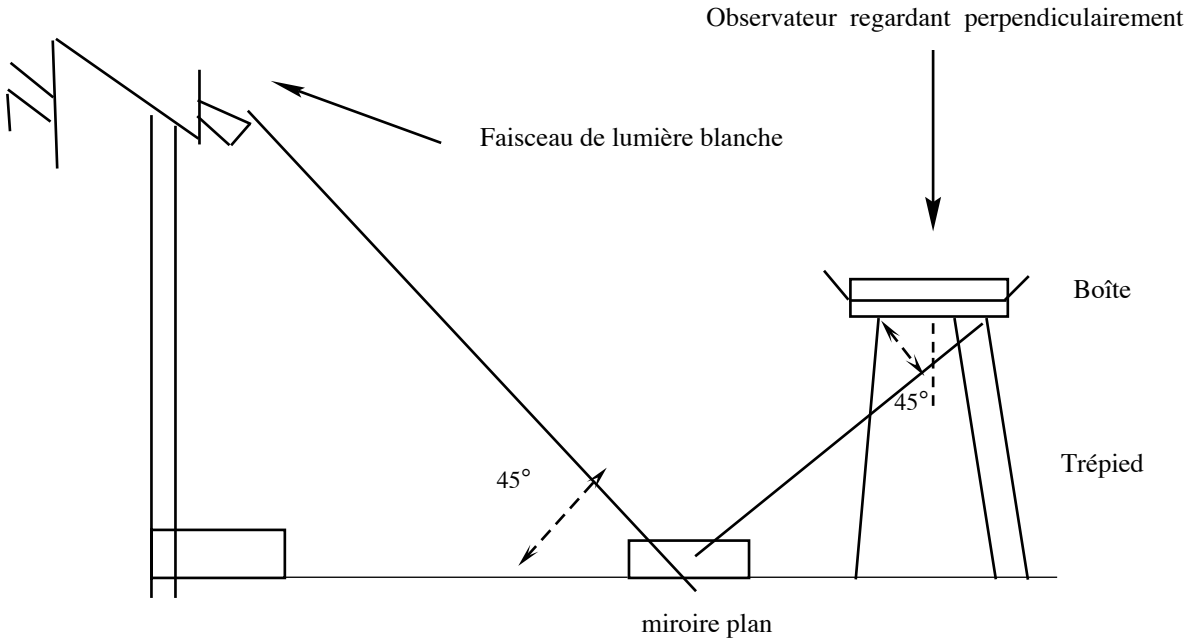


Figure 2- Examen des boîtes pour déceler des colonies suspectes

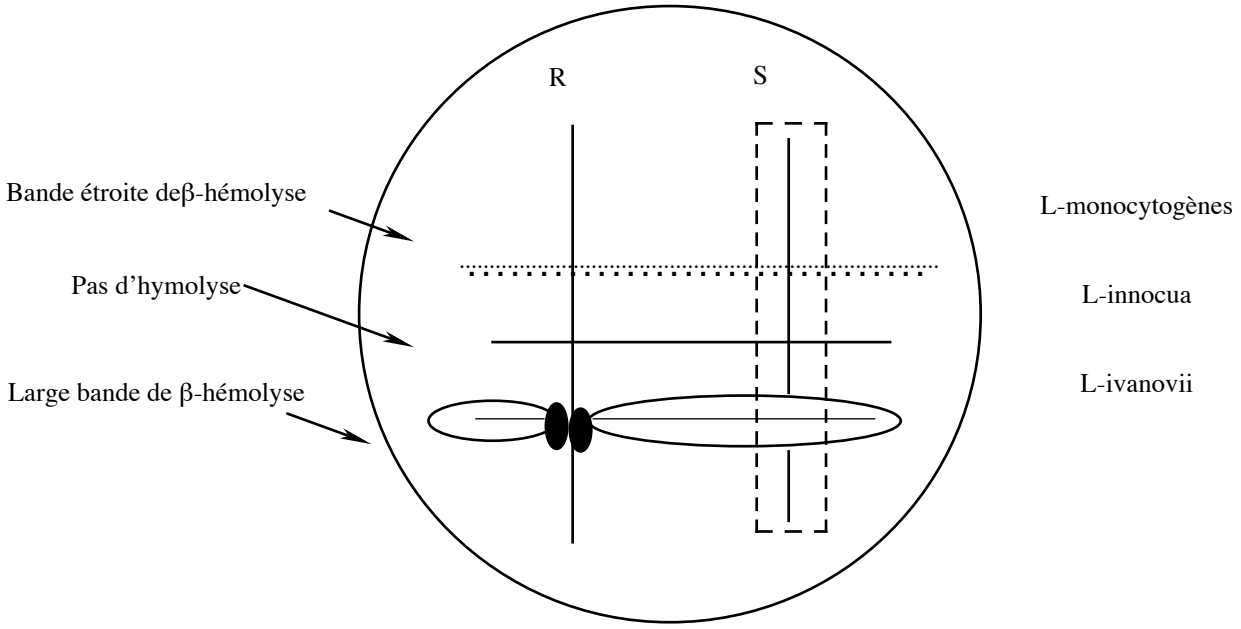


Figure 3- Ensemensement des boîtes pour l'essai de CAMP

Remarques

1- Ensemensement de fines boîtes de gélose au sang comme illustré sur le diagramme.
Les lignes verticales représentent les stries de s. aureus (S). Les lignes horizontales représentent les stries des cultures d'essai les parties hachurées indiquent les zones d'hémolyse développée.

2- La partie en pointillés délimite la zone d'influence de la culture de S. aureus.

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 28 Ramadhan 1433 correspondant au 16 août 2012 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en matière sèche dans le lait, la crème et le lait concentré non sucré.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n°10-149 du 14 Joumada Ethania 1431 correspondant au 28 mai 2010 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n°90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n°02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaâda 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 7 Rabie Ethani 1418 correspondant au 10 août 1997 relatif aux spécifications techniques des laits concentrés non sucrés et sucrés et aux conditions et modalités de leur présentation ;

Vu l'arrêté interministériel du 13 Chaâbane 1419 correspondant au 2 décembre 1998 relatif aux spécifications techniques des laits en poudre et aux conditions et modalités de leur présentation ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de détermination de la teneur en matière sèche dans le lait, la crème et le lait concentré non sucré.

Art. 2. — Pour la détermination de la teneur en matière sèche dans le lait, la crème et le lait concentré non sucré, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 28 Ramadhan 1433 correspondant au 16 août 2012.

Mustapha BENBADA.

ANNEXE

Méthode de la détermination de la teneur en matière sèche dans le lait, la crème et le lait concentré non sucré

La présente méthode prescrit la technique pour la détermination de la matière sèche du lait, de la crème et du lait concentré non sucré.

1. TERMES ET DÉFINITIONS

Pour les besoins de la présente méthode, les termes et définitions suivantes s'appliquent.

Matière sèche : Fraction massique des substances restant après la dessiccation complète spécifiée dans la présente méthode.

Note – La matière sèche est exprimée en pourcentage en masse.

2. PRINCIPE

Une prise d'essai est pré-séchée sur un bain d'eau bouillante et l'eau restante est par la suite évaporée dans une étuve à une température de 102°C ± 2°C.

3. APPAREILLAGE ET MATÉRIAUX

Sauf indication contraire, utiliser uniquement de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente.

Matériel courant de laboratoire et en particulier, ce qui suit.

3.1 Balance analytique

3.2 Dessiccateur, muni d'un déshydratant efficace (par exemple gel de silice récemment séché, avec un indicateur hygrométrique).

3.3 Bain d'eau bouillante, muni d'ouverture de dimensions réglables.

3.4 Etuve, ventilée, thermorégulée, pouvant être maintenue à 102°C ± 2°C dans tout l'espace de travail.

3.5 Capsules à fond plat, de 20 mm à 25 mm de hauteur, de 50 mm à 75 mm de diamètre, constituées d'un matériau approprié (par exemple, acier inoxydable, nickel ou aluminium), munies de couvercles bien ajustés et pouvant être ôtés aisément .

3.6 Bains d'eau.

3.6.1 Bain d'eau, réglable entre 35°C et 40°C.

3.6.2 Bain d'eau, réglable entre 40°C et 60°C.

3.7 Homogénéisateur, l'homogénéisateur est facultatif (5.1).

4. ECHANTILLONNAGE

L'échantillonnage se fait dans des conditions appropriées.

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport ou de l'entreposage.

5. PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR L'ESSAI

5.1 Lait

Amener l'échantillon à une température de 20°C à 25°C. Mélanger soigneusement afin d'obtenir une préparation homogène de la matière grasse dans l'échantillon. Ne pas agiter trop vigoureusement afin d'éviter la mousse ou le barattage de la matière grasse. S'il est difficile de disperser la couche de crème, chauffer lentement à une température de 35°C à 40°C, sur un bain d'eau (3.6.1), en mélangeant soigneusement de façon à incorporer la crème qui adhère au récipient. Refroidir l'échantillon rapidement à une température de 20°C à 25°C.

Un homogénéisateur peut être utilisé pour faciliter la dispersion de la matière grasse.

Note - Des résultats corrects ne peuvent être obtenus si l'échantillon contient de la matière grasse liquide apparente, ou si des particules blanches, de forme irrégulière, sont visibles et adhèrent aux parois du récipient.

5.2 Crème

Chauffer lentement l'échantillon à une température de 35°C à 40°C, sur un bain d'eau (3.6.1). Mélanger ou remuer la crème avec précaution et ne pas agiter trop vigoureusement afin d'éviter la mousse ou le barattage. Refroidir rapidement l'échantillon à une température de 20°C à 25°C. Afin de réduire au minimum l'évaporation de l'eau pendant le mélange, il convient que le récipient reste découvert aussi brièvement que possible.

Note - Des résultats corrects ne peuvent être obtenus si le mélange de l'échantillon n'est pas homogène ou si l'échantillon présente un début de barattage ou d'autres indices anormaux.

5.3 Lait concentré non sucré

Bien agiter le récipient en le retournant fréquemment. Ouvrir le récipient et verser le lait lentement dans un autre récipient en verre ou autre matériau approprié, pourvu d'un couvercle étanche, en prenant soin d'incorporer à l'échantillon la matière grasse ou les autres constituants pouvant adhérer à la paroi du premier récipient. Agiter vigoureusement et fermer le récipient.

Chauffer le récipient fermé dans un bain d'eau (3.6.2) entre 40°C et 60°C. Toutes les 15mn, sortir le récipient du bain et l'agiter fortement. Au bout de 2h, retirer le récipient et le refroidir à une température de 20°C à 25°C. Enlever le couvercle et bien mélanger en remuant l'échantillon avec une cuillère ou une spatule.

Note - Si la matière grasse se sépare, on ne peut pas espérer obtenir des résultats corrects.

6. MODE OPERATOIRE

6.1 Préparation de la capsule

Chauffer une capsule (3.5) avec son couvercle posé à côté, dans l'étuve (3.4) pendant au moins 1h. Mettre le couvercle sur la capsule et la placer immédiatement dans le dessiccateur (3.2).

Laisser refroidir à température ambiante (au moins 30 min) et peser à 0,1mg près.

6.2 Prise d'essai

Peser rapidement, à 0,1mg près, 1 g à 5 g (suivant la teneur estimée en matière sèche) de l'échantillon préparé, dans la capsule préparée (6.1). Dans le cas du lait ou de la crème, incliner la capsule de façon à étaler la prise d'essai uniformément au fond de la capsule. Dans le cas du lait concentré non sucré, ajouter 3 ml à 5 ml d'eau distillée ou d'eau de pureté au moins équivalente, incliner la capsule de façon à mélanger et à étaler la prise d'essai uniformément au fond de la capsule.

6.3 Détermination

6.3.1 Placer la capsule, sans le couvercle, sur le bain d'eau (3.3) maintenu vigoureusement à l'ébullition, de sorte que le fond de la capsule soit exposé de façon maximale à la vapeur et directement chauffé par celle-ci. Laisser la capsule pendant 30 min.

6.3.2 Retirer la capsule du bain d'eau et la chauffer, avec son couvercle posé à côté, dans l'étuve (3.4) pendant 2h. Mettre le couvercle sur la capsule et la placer immédiatement dans le dessiccateur (3.2).

6.3.3 Laisser refroidir la capsule à température ambiante (au moins 30 min) et peser à 0,1 mg près.

6.3.4 Chauffer à nouveau la capsule avec son couvercle posé à coté dans l'étuve pendant 1h.

Mettre le couvercle sur la capsule et la placer immédiatement dans le dessiccateur. Laisser refroidir comme en (6.3.3) et peser à 0,1 mg près.

6.3.5 Répéter les opérations spécifiées en (6.3.4) jusqu'à ce que la différence de masse entre deux pesées successives ne dépasse pas 1mg. Relever la masse la plus faible.

7. EXPRESSION DES RESULTATS

7.1 Mode de calcul

La matière sèche, exprimée en pourcentage en masse est égale à :

$$\frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

où

m_0 est la masse, en grammes, de la capsule et du couvercle (6.1) ;

m_1 est la masse, en grammes, de la capsule, du couvercle et de la prise d'essai (6.2) ;

m_2 est la masse, en grammes, de la capsule, du couvercle et de la prise d'essai sèche (6.3.5).

Arrondir la valeur obtenue à 0,01% (fraction massique) près.

7.2 Fidélité

Note - Les valeurs de répétabilité et de reproductibilité sont exprimées au niveau de probabilité 95% et proviennent des résultats d'un essai interlaboratoires.

7.2.1 Répétabilité

La différence entre deux résultats individuels, obtenus sur un produit identique soumis à essai par le même analyste utilisant le même appareillage dans un court intervalle de temps, n'excédera pas les valeurs suivantes de matière sèche pour 100 g de produit, en moyenne plus d'une fois sur 20 dans l'application normale et correcte de la méthode :

— pour le lait 0,10 g ;

— pour la crème 0,20 g ;

— pour le lait concentré non sucré 0,30 g.

7.2.2 Reproductibilité

La différence entre deux résultats individuels et indépendants, obtenus par deux opérateurs travaillant dans des laboratoires différents sur un produit identique, n'excédera pas les valeurs suivantes de matière sèche pour 100 g de produit, en moyenne plus d'une fois sur 20 dans l'application normale et correcte de la méthode.

— pour le lait 0,20 g ;

— pour la crème 0,35 g ;

— pour le lait concentré non sucré 0,50 g.

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 5 Safar 1435 correspondant au 8 décembre 2013 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur totale en matière sèche des fromages et des fromages fondus.

———

Le ministre du commerce ;

Vu le décret présidentiel n° 13-312 du 5 Dhou El Kaada 1434 correspondant au 11 Septembre 2013 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de la teneur totale en matière sèche des fromages et des fromages fondus.

Art. 2. — Pour la détermination de la teneur totale en matière sèche des fromages et des fromages fondus, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 5 Safar 1435 correspondant au 8 décembre 2013.

Mustapha BENBADA.

Annexe

Méthode de détermination de la teneur totale en matière sèche des fromages et des fromages fondus

La présente méthode constitue la référence pour la détermination de la teneur totale en matière sèche des fromages et des fromages fondus.

1. DEFINITION

Pour les besoins de la présente méthode, la définition suivante s'applique.

Teneur totale en matière sèche du fromage

Fraction massique de substances, déterminée selon le mode opératoire spécifié dans la présente méthode.

Note - La teneur totale en matière sèche est exprimée en pourcentage de la masse (fraction massique).

2. PRINCIPE

Séchage d'une prise d'essai pesée et mélangée avec du sable par chauffage dans une étuve réglée à 102°C.

Pesée de la prise d'essai séchée afin de déterminer la perte de masse.

3. REACTIFS

Sauf spécification contraire, utiliser exclusivement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté au moins équivalente.

3.1 Solution d'acide chlorhydrique (HCL), avec une fraction massique de 25 %.

3.2 Sable de quartz ou sable de mer

3.2.1 Le sable doit présenter une granulométrie lui permettant de passer au travers d'un tamis en toile métallique dont la maille est de 600 µm tout en étant retenu par un tamis dont la maille est de 150 µm.

Le sable doit satisfaire aux exigences de l'essai d'acceptation spécifié en (3.2.2).

3.2.2 Déposer environ 20 g de sable dans une capsule à fond plat (4.4) munie d'une baguette d'agitation (4.5). Chauffer la capsule ouverte contenant le sable ainsi que son couvercle et la baguette d'agitation dans l'étuve (4.3) réglée à 102°C pendant au moins 2 h. Remettre le couvercle sur la capsule et laisser cette dernière refroidir dans le dessiccateur (4.2) jusqu'à la température de la salle de pesée. Peser la capsule avec son couvercle en place à 1 mg près et enregistrer la masse avec quatre décimales.

Enlever le couvercle de la capsule et humidifier le sable avec environ 5 ml d'eau. Mélanger l'eau au sable à l'aide de la baguette d'agitation. Chauffer la capsule ouverte, son couvercle et la baguette d'agitation dans l'étuve (4.3) réglée à 102°C pendant, au moins, 4 h. Remettre le couvercle sur la capsule et la laisser refroidir dans le dessiccateur (4.2) jusqu'à la température de la salle de pesée. Peser la capsule avec son couvercle en place à 1 mg près et enregistrer la masse avec quatre décimales. L'écart entre les deux pesées ne doit pas dépasser 1 mg.

3.2.3 Si cette exigence n'est pas satisfaite, traiter le sable de la manière suivante :

immerger le sable dans une solution d'acide chlorhydrique (3.1) et l'y laisser pendant trois jours, en remuant de temps à autre. Décanter autant que faire se peut le liquide surnageant. Laver le sable à l'eau jusqu'à disparition de la réaction acide du liquide surnageant. Chauffer le sable à environ 160°C pendant, au moins, 4 h. Renouveler ensuite l'essai d'acceptation décrit en (3.2.2).

4. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit :

4.1 Balance analytique, capable de peser à 1 mg près et avec une précision de lecture de 0,1 mg.

4.2 Dessiccateur, rempli d'un déshydratant approprié (par exemple du gel de silice fraîchement séché contenant un indicateur hygrométrique).

En alternative, il est possible d'utiliser une plaque en métal ou en verre convenant à un séchage rapide des capsules. Cette plaque doit être installée dans une armoire fermée au travers de laquelle passe un flux d'air sec.

4.3 Etuve ventilée, à chauffage électrique, munie d'ouïes de ventilation complètement ouvertes, réglable à (l02 ± 2) °C et maintenant une température uniforme en tous points de l'espace de travail. L'étuve doit être dotée d'un thermomètre approprié.

4.4 Capsules à fond plat, en matériau adéquat (par exemple acier inoxydable, nickel ou aluminium), de 20 mm à 25 mm de hauteur, de diamètre compris entre 60 mm et 80 mm et dotées de couvercles parfaitement adaptés et faciles à enlever.

4.5 Baguettes d'agitation, en verre ou en métal, avec une extrémité aplatie et d'une longueur suffisante pour que la baguette d'agitation repose contre la paroi interne de la capsule en formant un angle avec celle-ci juste en dessous du bord.

4.6 Appareil pour broyer ou râper, facile à nettoyer et approprié pour la préparation de l'échantillon pour essai.

5. ECHANTIOLLONNAGE

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ni modifié lors du transport et de l'entreposage.

L'échantiollonnage se fait selon une méthode appropriée.

Conserver les échantillons pour essai a une température comprise entre 0 °C et 20 °C depuis l'échantillonnage jusqu'au début du mode opératoire. La composition des échantillons ne doit pas être affectée au cours de l'entreposage.

6. PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI

Avant l'analyse, enlever la croûte, la morge ou la surface moisie du fromage de manière à obtenir un échantillon représentatif du fromage tel qu'il est habituellement consommé.

Broyer ou râper l'échantillon pour essai en utilisant un appareil pour broyer ou râper approprié (4.6). Mélanger rapidement la masse moulue ou râpée et, si nécessaire pour les fromages à pâte dure ou semi-dure, la broyer une seconde fois et mélanger de nouveau soigneusement. Dans le cas des fromages à pâte dure et à pâte semi-dure, les couper de préférence en cubes d'environ 15 mm de côté.

Mélanger les cubes en les secouant dans un récipient. Broyer ou râper l'échantillon pour essai comme indiqué précédemment. Nettoyer l'appareil après la préparation de chaque échantillon.

Si l'échantillon ne peut être ni broyé ni râpé, le mélanger soigneusement par malaxage approfondi, par exemple dans un mortier à l'aide d'un pilon. Prendre garde d'éviter toute perte d'humidité.

Conserver l'échantillon préparé dans un récipient hermétique à l'air jusqu'au moment de l'analyse, laquelle doit être effectuée dans les plus brefs délais après le broyage.

Cependant, si un délai est inévitable, prendre toutes précautions pour assurer une conservation adéquate de l'échantillon. En cas de réfrigération, ramener l'échantillon à température ambiante. Mélanger soigneusement l'échantillon pour pallier le transfert d'humidité dans le fromage qui se produit au cours du refroidissement et du réchauffement. S'assurer que toute condensation à la surface interne du récipient est convenablement et uniformément réincorporée dans l'échantillon pour essai.

Ne pas analyser de fromage broyé présentant un développement de moisissure non désiré ou des signes de détérioration.

7. MODE OPERATOIRE

7.1 Essai à blanc

Parallèlement à la détermination de la prise d'essai (7.3), effectuer un essai à blanc selon le même mode opératoire que pour la préparation de la capsule (7.2) et la détermination (7.3), mais sans la prise d'essai.

7.2 Préparation de la capsule

7.2.1 Chauffer la capsule (4.4) ouverte contenant environ 20 g de sable (3.2) ainsi que son couvercle et la baguette d'agitation (4.5) dans l'étuve (4.3) réglée à 102°C. Laisser le contenu de la capsule atteindre 102°C, puis sécher le contenu pendant, au moins, 1 h.

La période de séchage indiquée en (7.2.1), (7.3.3) et (7.3.6) commence lorsque le contenu de la capsule atteint la température de 102°C. Le temps nécessaire pour atteindre cette température dépend de la puissance, de la fréquence, de ventilation et de la taille de l'étuve. Cette durée de montée en température est également fonction du nombre de capsules placées dans l'étuve, de leur masse et du matériau les constituant. Il convient que cette durée de montée en température soit déterminée expérimentalement.

7.2.2 Remettre le couvercle sur la capsule et la mettre immédiatement dans le dessiccateur (4.2). Laisser refroidir la capsule jusqu'à température ambiante dans le dessiccateur. Une fois la capsule refroidie, la sortir du dessiccateur et la peser avec son couvercle et la baguette d'agitation à 1 mg près et enregistrer la masse avec quatre décimales.

La période de refroidissement indiquée en (7.2.2), (7.3.4) et (7.3.5) dépend de la capacité de refroidissement du dessiccateur mais aussi du nombre de capsules placées dans le dessiccateur, de leur masse et du matériau les constituant.

Il convient que cette période de refroidissement soit déterminée expérimentalement.

7.3 Détermination

7.3.1 Pencher la capsule pour faire glisser le sable d'un côté de celle-ci. Placer environ 3 g d'échantillon pour essai (6) sur une surface de la capsule exempte de sable, peser la capsule ainsi que son couvercle et la baguette d'agitation à 1 mg près et enregistrer la masse avec quatre décimales.

7.3.2 Mélanger soigneusement la prise d'essai et le sable et répartir le mélange de manière homogène sur le fond de la capsule. Laisser l'extrémité aplatie de la baguette d'agitation dans le mélange, l'autre extrémité s'appuyant sur la paroi de la capsule.

Note - Il peut être plus facile de mélanger le sable à des fromages à pâte dure en ajoutant environ 3 ml d'eau afin de saturer le sable.

7.3.3 Chauffer la capsule, avec son couvercle placé à côté d'elle, dans l'étuve (4.3) réglée à 102°C. Laisser le contenu de la capsule atteindre 102°C, puis sécher le contenu pendant, au moins, 3 h.

7.3.4 Remettre le couvercle sur la capsule. Laisser celle-ci refroidir dans le dessiccateur (4.2) jusqu'à température ambiante. Peser la capsule avec son couvercle à 1 mg près et enregistrer la masse avec quatre décimales.

7.3.5 Chauffer de nouveau la capsule avec son couvercle comme indiqué en (7.3.3), mais pendant 1 h au lieu de 3 h. Remettre le couvercle sur la capsule et la laisser refroidir jusqu'à la température ambiante dans le dessiccateur (4.2). Peser de nouveau la capsule avec son couvercle à 1 mg près et enregistrer la masse avec quatre décimales.

7.3.6 Renouveler le mode opératoire décrit en (7.3.5) jusqu'à observer, entre deux pesées successives, une diminution de masse inférieure ou égale à 2 mg ou une augmentation de masse. Enregistrer la masse minimale de la capsule.

8. CALCUL ET EXPRESSION DES RESULTATS

8.1 Calcul

Calculer la teneur totale en matière sèche de l'échantillon pour essai, wt, exprimée en pourcentage de la masse, à l'aide de l'équation suivante:

$$W_t = \frac{(m_2 - m_0) - (m_3 - m_4)}{m_1 - m_0} \times 100\ \%$$

où :

m_0 : est la masse, en grammes, de la capsule préparée (7.2.2);

m1 : est la masse, en grammes, de la prise d'essai et de la capsule avant dessiccation (7.3.1);

m2 : est la masse, en grammes, de la prise d'essai et de la capsule après dessiccation (7.3.6);

m3 : est la masse, en grammes, de la capsule utilisée pour l'essai à blanc (7.1), pour le même temps de dessiccation (7.3.6) que *m*2;

m4 : est la masse, en grammes, de la capsule préparée (7.2.2) utilisée pour l'essai à blanc (8.1).

8.2 Expression des résultats

Exprimer les résultats obtenus avec deux décimales.

9. FIDELITE

9.1 Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même appareillage dans un court intervalle de temps, n'excédera 0,35 % (en masse) que dans 5 % des cas au plus. .

9.2 Reproductibilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans des laboratoires différents par des opérateurs différents utilisant des appareillages différents, n'excédera 0,55 % (en masse) que dans 5 % des cas au plus.

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 20 Chaoual 1434 correspondant au 27 août 2013 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en azote protéique dans le lait.

— — — —

Le ministre du commerce ;

Vu le décret présidentiel n° 12-326 du 17 Chaoual 1433 correspondant au 4 septembre 2012 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou El Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 29 Safar 1414 correspondant au 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation ;

Vu l'arrêté interministériel du 7 Rabie Ethani 1418 correspondant au 10 Août 1997 relatif aux spécifications techniques des laits concentrés non sucrés et sucrés et aux conditions et modalités de leur présentation ;

Arrête :

Article ler. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 3 Rajab 1410 correspondant au 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de la teneur en azote protéique dans le lait.

Art. 2. — Pour la détermination de la teneur en azote protéique dans le lait, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 20 Chaoual 1434 correspondant au 27 août 2013.

Mustapha BENBADA.

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE LA TENEUR EN AZOTE PROTEIQUE DANS LE LAIT

La présente méthode spécifie une technique pour la détermination directe de la teneur en azote protéique du lait liquide, entier ou écrémé.

1. DEFINITION

Pour les besoins de la présente méthode, la définition suivante s'applique :

Teneur en azote protéique :

Rapport de masse des substances, déterminé directement ou indirectement par le mode opératoire décrit dans la présente méthode.

Note - La teneur en azote protéique est exprimée sous forme de pourcentage en masse.

2. PRINCIPE

Précipitation des protéines d'une prise d'essai par addition de solution d'acide trichloroacétique, de sorte que la concentration finale de l'acide trichloroacétique dans le mélange soit d'environ 12%. Séparation du précipité de protéines par filtration (le filtrat contient l'azote non protéique), détermination de la teneur en azote du filtrat par le mode opératoire décrit dans la méthode de détermination de la teneur en azote dans le lait.

3. REACTIFS

Sauf indication différente, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée, ou de l'eau de pureté au moins équivalente. Les réactifs à utiliser sont ceux spécifiés pour le dosage de l'azote total selon la méthode de détermination de la teneur en azote dans le lait, et les réactifs énumérés ci-après :

3.1 Solution d'acide trichloroacétique ($CC^1{}_3COOH$).

Dans une fiole jaugée de 100 ml, dissoudre 15,0 g d'acide trichloroacétique dans de l'eau et diluer jusqu'au repère. Ne pas utiliser de concentrations d'acide trichloroacétique et de volumes de solutions différents de ceux spécifiés.

Les performances de la méthode en ce qui concerne la valeur moyenne et les caractéristiques de performances interlaboratoires seront différentes en cas d'utilisation d'autres concentrations d'acide trichloroacétique ou d'autres volumes de solutions.

3.2 Solution volumétrique standard d'acide chlorhydrique c(HCl) = (0,1 ± 0,0005) mol/I.

4. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire, ainsi que, le matériel utilisé dans la méthode de détermination de la teneur en azote dans le lait et en particulier, le matériel suivant :

4.1 Bain d'eau, pouvant être maintenu à une température de 38° C ± 2° C ;

4.**2 Pipette,** d'une capacité de 5 ml ;

4.**3 Entonnoir de filtration,** en verre, de 75 mm de diamètre ;

4.4 Papier-filtre, exempt d'azote, de 15 cm de diamètre ;

4.5 Pipette automatique ou pipette à piston, permettant d'obtenir des doses de 10 ml.

5. ECHANTILLONNAGE

L'échantillonnage se fait dans des conditions appropriées.

6. PRÉPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI

Chauffer l'échantillon pour essai dans le bain d'eau (4.1) réglé à 38° C ± 2 °C. Bien mélanger, mais délicatement, au moyen de retournements répétés du récipient, sans causer ni mousse ni barattage. Laisser refroidir l'échantillon à température ambiante immédiatement avant de peser la prise d'essai (7.1).

7. MODE OPÉRATOIRE

7.1 Prise d'essai

Pipeter environ 5,0 ml ± 0,1 ml de l'échantillon pour essai préparé (6) dans un ballon de Kjeldahl ou dans un tube de minéralisation propre et sec, préalablement pesé à 0,1 mg près. Peser l'échantillon à 0,1 mg près. Ajouter immédiatement 5 ml ± 0,1 ml d'eau au ballon ou au tube et rincer tout résidu d'échantillon restant sur le col en faisant couler l'eau de rinçage au fond du ballon ou du tube.

Note - L'utilisation d'un ballon de Kjeldahl ou d'un tube de minéralisation est fonction de la méthode choisie par le laboratoire.

7.2 Détermination directe

7.2.1 Précipitation et filtration

Ajouter 40 ml ± 0,5 ml de solution d'acide trichloroacétique (3.1) au ballon de Kjeldahl ou au tube de minéralisation contenant la prise d'essai (7.1) et agiter pour mélanger le contenu.

Laisser reposer le ballon ou le tube pendant 5 min environ pour permettre au précipité de se déposer. Filtrer le contenu du ballon ou du tube au travers d'un papier-filtre (4.4) placé dans un entonnoir de filtration (4.3).

Recuillir le filtrat dans une fiole conique propre. Une partie du précipité restera dans le ballon de Kjeldahl ou dans le tube de minéralisation et une autre partie sera recueillie sur le papier-filtre. Il n'est pas nécessaire de retirer tout le précipité du ballon ou du tube.

Immédiatement après avoir versé le mélange et pour ne pas laisser à une partie du précipité le temps de sécher sur le col du ballon ou du tube, ajouter, à l'aide d'une pipette automatique (4.5), 10 ml de la solution d'acide trichloroacétique (3.1).

Utiliser également cette solution pour rincer tout résidu de précipité restant sur le col, en laissant couler le liquide de rinçage au fond du ballon ou du tube.

Agiter par un mouvement de rotation pour mélanger le contenu. Verser le contenu ainsi obtenu du ballon ou du tube au travers du même papier-filtre. Ajouter ce filtrat à celui qui a été recueilli auparavant dans la fiole conique. Une nouvelle fois, rincer immédiatement le col du ballon ou du tube avec une nouvelle dose de 10 ml de solution d'acide trichloroacétique et agiter pour mélanger le contenu. Verser pour la troisième fois le contenu du ballon ou du tube au travers du même papier-filtre, en ajoutant le filtrat à celui qui a été recueilli auparavant dans la fiole conique.

Le filtrat obtenu doit être transparent et exempt de particules de matière. À ce stade, le filtrat n'est plus nécessaire et peut être mis au rebut de manière appropriée.

Si l'on doit effectuer des essais répétés du même échantillon pour essai, deux opérations distinctes de précipitation et de filtration doivent être effectuées avec chaque échantillon pour essai.

7.2.2 Préparation du filtrat

En portant des gants, retirer doucement le papier-filtre de l'entonnoir de filtration et plier le papier pour enfermer le précipité. S'il subsiste une trace de précipité sur la lèvre intérieure ou extérieure du ballon de Kjeldahl ou du tube de minéralisation, essuyer ces résidus avec le papier filtre replié, de façon que tout résidu de précipité adhère au papier, puis déposer le papier-filtre à son tour dans le ballon de Kjeldahl ou dans le tube de minéralisation.

7.2.3 Minéralisation et distillation

Ajouter la quantité appropriée de corps facilitant l'ébullition, de sulfate de potassium, de solution de sulfate de cuivre et d'acide sulfurique au ballon de Kjeldahl ou au tube de minéralisation et poursuivre le processus de minéralisation et de distillation selon le mode opératoire décrit, respectivement dans la méthode de détermination de la teneur en azote dans le lait.

7.2.4 Essai à blanc

Réaliser un essai à blanc en remplaçant la prise d'essai par un papier-filtre (4.4) lavé avec une solution d'acide trichloroacétique (3.1) et en procédant comme décrit en (7.2.1) à (7.2.3). Toujours titrer les prises d'essai à blanc avec le même réactif et le même appareillage que pour les prises d'essai.

Consigner les valeurs à blanc. Si ces valeurs varient, identifier la cause de ce changement.

7.3 Détermination indirecte

En alternative à la détermination directe (7.2), la teneur en azote protéique d'un échantillon pour essai peut être calculée en ayant recours à une détermination indirecte classique.

Cela se fait en soustrayant la teneur en azote non protéique de la teneur en azote total du même échantillon pour essai, déterminé selon la méthode de détermination de la teneur en azote dans le lait.

Pour exprimer la teneur en protéines vraies, le résultat obtenu pour la teneur en azote protéique est multiplié par 6,38.

8. CALCUL ET EXPRESSION DES RESULTATS

8.1 Calcul de la teneur en azote protéique

8.1.1 Calculer la teneur en azote protéique de l'échantillon pour essai, ^{w}pn, à l'aide de l'équation suivante :

$$^{w}pn = \frac{1{,}4007\ (V_S - V_b)\ M_r}{m}$$

Où

Wpn : est la teneur en azote protéique de l'échantillon pour essai, exprimée sous forme de pourcentage en masse ;

Vs : est la valeur numérique du volume, en millilitres, de l'acide chlorhydrique (3.2) utilisé dans la détermination, exprimée à 0,05 ml près ;

Vb : est la valeur numérique du volume, en millilitres, de l'acide chlorhydrique (3.2) utilisé dans l'essai à blanc, exprimée à 0,05 ml près ;

Mr : est la valeur numérique de la molarité exacte de l'acide chlorhydrique (3.2), exprimée à quatre décimales près ;

m : est la valeur numérique, en grammes, de la masse de la prise d'essai (7.1), exprimée à 0,1 mg près.

8.1.2 Exprimer les résultats obtenus à quatre décimales près, si c'est nécessaire pour des calculs ultérieurs. S'il s'agit de résultats finaux, exprimer la teneur en azote à trois décimales près et la teneur en protéines à deux décimales.

Il convient de ne pas arrondir les résultats avant l'utilisation finale de la valeur d'essai.

Note - Cela est particulièrement vrai lorsque les valeurs sont appelées à être utilisées pour des calculs ultérieurs. C'est le cas, par exemple, lorsque les valeurs d'essai individuelles obtenues à partir de l'analyse de plusieurs échantillons sont utilisées pour calculer les statistiques de performance de la méthode concernant les variations intralaboratoires et interlaboratoires.

C'est également le cas lorsque les valeurs servent de référence pour l'étalonnage d'un instrument (par exemple un analyseur de lait à infrarouge), où les valeurs concernant plusieurs échantillons seront utilisées pour un calcul de régression simple ou multiple.

Dans ces cas-là, il convient de ne pas arrondir les résultats obtenus avant de les utiliser pour les calculs ultérieurs.

8.2 Calcul de la teneur en protéines vraies

8.2.1 Calculer la teneur en protéines vraies de l'échantillon pour essai, W_p, à l'aide de l'équation suivante:

$$W_p = W_{pn} \times 6{,}38$$

Où

W_p: est la teneur en protéines vraies de l'échantillon pour essai, exprimée sous forme de pourcentage en masse ;

W_{pn} : est la teneur en azote protéique de l'échantillon pour essai, exprimée sous forme de pourcentage en masse, à quatre décimales près (8.1) ;

6,38 : est le coefficient multiplicateur généralement admis pour exprimer la teneur en azote en tant que teneur en protéines vraies.

8.2.2 Exprimer les résultats obtenus pour la teneur en protéines vraies à trois décimales près, si c'est nécessaire pour des calculs ultérieurs. S'il s'agit de résultats finaux (8.1), deux décimales suffisent.

9. FIDELITE

9.1 Essai interlaboratoires

Les valeurs de répétabilité et de reproductibilité sont issues des résultats d'un essai interlaboratoires. Les valeurs dérivées de cet essai peuvent ne pas être applicables aux plages de concentration et matrices autres que celles indiquées.

9.2 Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même appareillage dans un court intervalle de temps, n'excédera que dans 5 % des cas au plus les valeurs suivantes :

— 0,0038 % pour la teneur en azote protéique ;

— 0,024 % pour la teneur en protéines vraies.

9.3 Reproductibilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans des laboratoires différents par des opérateurs différents utilisant des appareillages différents, n'excédera que dans 5 % des cas au plus les valeurs suivantes :

— 0,0092 % pour la teneur en azote protéique ;

— 0,059 % pour la teneur en protéines vraies.

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 14 Safar 1435 correspondant au 17 décembre 2013 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en matière grasse dans le fromage.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 13-312 du 5 Dhou EL Kaada 1434 correspondant au 11 septembre 2013 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Arrête :

Article ler. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de la teneur en matière grasse dans le fromage.

Art. 2. — Pour la détermination de la teneur en matière grasse dans le fromage, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 14 Safar 1435 correspondant au 17 décembre 2013.

Mustapha BENBADA.

— — — — — — — —

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE LA TENEUR EN MATIERE GRASSE DANS LE FROMAGE

La présente méthode dite (Van Gulik) spécifie une technique pour la détermination de la teneur en matière grasse dans les fromages (fraction massique).

Cette méthode est applicable à tous les types de fromages. Cependant, elle peut ne pas donner entièrement satisfaction lorsqu'elle est appliquée à des fromages à moisissures internes (fromages bleus).

1. DEFINITIONS

Pour les besoins de la présente méthode, les définitions suivantes s'appliquent :

1.1 Méthode Van Gulik

Technique conventionnelle qui, appliquée à un fromage, donne une teneur en matière grasse, exprimée en grammes pour 100 g de fromage.

1.2 Teneur en matière grasse du fromage

Fraction massique de substances déterminée selon le mode d'emploi spécifié dans la présente méthode.

Note - La teneur en matière grasse est exprimée en grammes pour 100 g, numériquement équivalent à une fraction massique en pourcentage.

2. PRINCIPE

Après dissolution des protéines du fromage au moyen d'acide sulfurique, il est procédé à la séparation de la matière grasse par centrifugation dans un butyromètre de Van Gulik (4.1), la séparation étant favorisée par l'addition d'une petite quantité d'alcool iso-amylique.

Obtention de la teneur en matière grasse par lecture directe sur l'échelle du butyromètre.

3. REACTIFS

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente.

3.1 Acide sulfurique

L'acide sulfurique doit avoir une masse volumique, à 20° C, de (1,522 ± 0,005) g/ml, ce qui correspond à une fraction volumique de 61,72 % à 62,63 % de H_2S0_4. L'acide doit être incolore ou à peine ambré, et ne contenir aucune impureté pouvant agir sur les résultats.

3.2 Alcool iso-amylique

3.2.1 Composition

Une fraction volumique d'au moins 99% d'alcool iso-amylique doit être composée des alcools primaires 3-méthylbutane-l-ol et 2-méthylbutane-1-ol, les seules impuretés notables tolérées étant le 2-méthylpropane-l-ol et le butane-1-ol. Il doit être exempt de pentanols secondaires, de 2-méthylbutane-2- 01, furane-2-al (furfural,furane- 2-carboxaldéhyde, 2-furaldéhyde), d'essence et de dérivés du benzène. Seules des traces d'eau peuvent être tolérées.

3.2.2 Aspect

L'alcool iso-amylique doit être clair et incolore.

3.2.3 Masse volumique

L'alcool iso-amylique doit avoir une masse volumique à 20° C de 0,808 g/ml à 0,818 g/ml.

3.2.4 2- Furaldéhyde et autres impuretés organiques

Un mélange de 5 ml d'alcool iso-amylique et de 5 ml d'acide sulfurique (3.1) doit avoir au plus une couleur jaune ou légèrement brune.

3.2.5 Intervalle de distillation

Quand l'alcool iso-amylique est distillé sous une pression de 101,3 kPa, une fraction volumique d'au moins 98% doit être distillé au-dessous de 132° C et une fraction volumique de pas plus de 5 % en dessous de 128° C. L'alcool ne doit laisser aucun résidu après distillation.

Si, au cours de la distillation, la pression atmosphérique est inférieure ou supérieure à 101,3 KPa, il est recommandé respectivement d'abaisser ou d'élever les températures indiquées de 3,3° C/ KPa.

3.2.6 Essai de conformité

Un alcool iso-amylique peut satisfaire aux exigences de (3.2.1 à 3.2.5) et n'être pas utilisable pour la méthode Van Gulik. En conséquence, vérifier, avant utilisation, l'aptitude à l'emploi de l'alcool iso-amylique, au moyen des essais comparatifs suivants effectués avec un alcool iso-amylique étalon.

3.2.6.1 Alcool iso-amylique étalon

Distiller un alcool iso-amylique satisfaisant aux exigences de (3.2.1 à 3.2.5), avec une colonne de fractionnement convenable, en prenant une fraction dans un intervalle de 2° C entre 128° C et 131,5° C (3.2.5).

Effectuer les essais suivants sur cette fraction :

a) Lorsqu'on la contrôle par chromatographie gaz-liquide, elle doit être composée d'au moins 99 % (fraction volumique) de méthyl-3 butanol-l et de méthyl-2 butanol-l.Les impuretés autres que le méthyl-2 propanol-l et le butanol-l ne doivent être présentes qu'à l'état de traces.

b) Lorsqu'elle est distillée par fractionnement, les premiers 10 % par volume et les derniers 10 % par volume recueillis lorsqu'ils sont comparés au moyen du mode opératoire décrit en (3.2.6.2), doivent donner des teneurs en matière grasse du lait ne différant pas de plus de 0,015 % par masse.

Si la fraction satisfait à ces deux essais, elle peut être considérée comme alcool iso-amylique étalon. L'alcool iso-amylique étalon peut être utilisé pendant plusieurs années, pour autant qu'il soit conservé dans un endroit sombre et frais.

3.2.6.2 Mode opératoire pour les essais comparatifs

Déterminer en double, par la méthode Gerber , la teneur en matière grasse de quatre échantillons de lait entier ayant une teneur moyenne en matière grasse, en se servant du butyromètre dont l'erreur de graduation a été déterminée, et l'acide sulfurique de qualité convenable.

Dans un échantillon de chaque paire, utiliser 1 ml d'alcool iso-amylique soumis à vérification et, dans l'autre, 1 ml d'alcool iso-amylique étalon (3.2.6.1).

Conserver les butyromètres placés au hasard à partir de l'agitation jusqu'à la fin de l'opération. Effectuer les lectures (par deux personnes au moins) à 0,02% par masse de matière grasse près, et les corriger ensuite pour tenir compte des erreurs d'échelles des butyromètres.

La teneur moyenne en matière grasse des quatre échantillons de lait, obtenue avec l'alcool iso-amylique à vérifier, ne doit pas différer de plus de 0,015 % par masse de matière grasse de la valeur moyenne obtenue avec l'alcool iso-amylique étalon.

Au lieu de l'alcool iso-amylique spécifié, on peut utiliser un alcool iso-amylique artificiel ou de remplacement, éventuellement coloré, pourvu qu'il soit reconnu satisfaisant aux essais selon le mode opératoire décrit dans le présent paragraphe.

4. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit:

4.1 Butyromètre Van Gulik ;

4.2 Système de pesage, adaptable au gros bouchon du butyromètre. Une capsule ou une feuille de matière plastique peut également être utilisée ;

4.3 Pipette ou appareillage de mesurage automatique, permettant de délivrer l'acide sulfurique (3.1) ;

4.4 Pipette ou appareillage de mesurage automatique, permettant de délivrer (1 ± 0,05) ml d'alcool iso-amylique (3.2) ;

4.5 Balance analytique, pouvant peser à 0,001 g près ;

4.6 Centrifugeuse, dans laquelle les butyromètres peuvent être placés, munie d'un indicateur de fréquence de rotation gradué en nombre de tours à la minute, avec une tolérance maximale de ± 50 r/min et de préférence à chargement vertical plutôt qu'à chargement horizontal.

La centrifugeuse, lorsqu'elle est chargée, doit être capable d'exercer en 2 min une accélération centrifuge relative de (350 ± 50) g à l'extrémité du bouchon du butyromètre.

Une telle accélération centrifuge peut être obtenue avec des centrifugeuses ayant le rayon effectif suivant (distance horizontale entre l'axe de la centrifugeuse et l'extrémité extérieure des bouchons des butyromètres) et fonctionnant à la fréquence de rotation indiquée dans le tableau suivant :

Rayon effectif de centrifugeuse et fréquence de rotation pour produire une accélération centrifuge de (350 ± 50) g

Rayon effectif mm	Fréquence de rotation ± 70 r/min
240	1140
245	1130
250	1120
255	1110
260	1100
265	1090
270	1080
275	1070
300	1020
325	980

Note - L'accélération centrifuge relative obtenue dans une centrifugeuse est donnée par la formule suivante :

$$1{,}12\ r\ n^2 \times 10^{-6}$$

Où

r : est le rayon horizontal effectif, en millimètres ;

n : est la fréquence de rotation, en tours par minute.

4.7 Bain d'eau, pour les butyromètres, pouvant être maintenus à la température de (65 ± 2°) C et permettant de maintenir les butyromètres (4.1) en position verticale, les échelles étant entièrement immergées ;

4.8 Thermomètre, approprié, destiné à vérifier la température du bain d'eau (4.7) ;

4.9 Râpe, ou autre appareil pour broyer le fromage.

5. ECHANTILLONNAGE

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

6. MODE OPERATOIRE

6.1 Préparation de l'échantillon pour essai

Retirer la croûte ou la partie superficielle tachée ou moisie du fromage, de façon à obtenir un échantillon représentatif du fromage, tel qu'il est consommé. Broyer l'échantillon avec un broyeur approprié (4.9). Mélanger rapidement la partie broyée et, si possible, broyer et mélanger soigneusement une seconde fois.

Si l'échantillon (par exemple du fromage à pâte molle) ne peut pas être broyé, le mélanger avec soin en le pétrissant énergiquement.

Transférer immédiatement l'échantillon prétraité, ou une portion représentative de celui-ci, dans un récipient muni d'un couvercle étanche à l'air.

Effectuer l'analyse, le plus tôt possible après broyage et mélange. Si un délai est inévitable, prendre toutes les précautions pour conserver l'échantillon de façon convenable et pour éviter la condensation de la vapeur d'eau à l'intérieur du récipient.

Il est recommandé de ne pas analyser des fromages broyés ou mélangés montrant la poussée de moisissures non désirées ou les signes d'un début d'altération.

Nettoyer le dispositif après avoir broyé chaque échantillon.

6.2 Prise d'essai

Peser, à 0,005 g près, 3 g de l'échantillon pour essai (6.1) dans un système de pesage adapté à un bouchon approprié (4.2) ou dans une capsule, ou sur une feuille de matière plastique.

6.3 Détermination

6.3.1 Si l'on utilise un système de pesage adapté à un bouchon, fermer le col du butyromètre (4.1) avec ce bouchon muni du système de pesage contenant la prise d'essai et ajouter de l'acide sulfurique (3.1) par l'ouverture étroite jusqu'à ce que le niveau de l'acide atteigne une hauteur d'environ les deux tiers de la chambre du butyromètre et que le système de pesage soit complètement recouvert d'acide sulfurique.

Si l'on n'utilise pas le système de pesage, fermer l'ouverture étroite du butyromètre (4.1) avec le petit bouchon et introduire l'acide sulfurique par le col jusqu'à ce que le niveau de l'acide atteigne une hauteur d'environ la moitié de la chambre.

Transvaser le fromage dans le butyromètre. Dans le cas d'utilisation d'une feuille de matière plastique, introduire le fromage avec la feuille. Fermer le col avec le gros bouchon, retourner le butyromètre et enlever le petit bouchon.

6.3.2 Placer le butyromètre, col en bas (c'est-à-dire large ouverture) durant 5 min, dans le bain d'eau (4.7), à (65 ± 2°) C.

6.3.3 Retirer le butyromètre du bain d'eau et l'agiter énergiquement durant l0 s.

6.3.4 Répéter les opérations décrites en (6.3.2) et (6.3.3) jusqu'à ce que les protéines soient complètement dissoutes. En général 1 h est nécessaire pour atteindre ce résultat. Poursuivre ces opérations durant 15 min après que les protéines ont été dissoutes.

Note - Il est possible d'utiliser un appareil d'agitation mécanique pour autant qu'il donne les mêmes résultats qu'avec l'agitation manuelle spécifiée ci-dessus.

6.3.5 Retirer le butyromètre du bain d'eau et, après avoir soigneusement agité, ajouter 1 ml d'alcool iso-amylique (3.2) par l'ouverture étroite. Agiter immédiatement durant au moins 3 s.

6.3.6 Ajouter de l'acide sulfurique par l'ouverture étroite jusqu'à ce que le niveau atteigne le trait repère 35 % de l'échelle. Fermer immédiatement avec le petit bouchon et retourner le butyromètre.

6.3.7 Agiter le butyromètre énergiquement durant 10 s dès que la matière grasse est montée dans la chambre du butyromètre. Retourner à nouveau de façon que l'acide s'écoule de la tige. Répéter deux fois les opérations de retournement et d'agitation.

6.3.8 Placer le butyromètre, col en bas, dans le bain d'eau durant 5 min, le niveau de l'eau étant maintenu au-dessus du sommet de la colonne de matière grasse dans le butyromètre.

6.3.9 Retirer le butyromètre du bain d'eau, ajuster le gros bouchon de façon à amener la colonne de matière grasse dans la partie graduée, et centrifuger le butyromètre à une accélération centrifuge relative de (350 ± 50) g durant 10 min.

6.3.10 Placer le butyromètre, col en bas, dans le bain d'eau durant 5 min, le niveau de l'eau étant maintenu au-dessus du sommet de la colonne de matière grasse dans le butyromètre.

6.3.11 Retirer le butyromètre du bain d'eau et ajuster soigneusement le gros bouchon afin d'amener l'extrémité inférieure de la colonne de matière grasse, en la déplaçant au minimum, à un trait repère et, de préférence, à un trait repère chiffré. Opérer de préférence en tirant légèrement sur le bouchon et non en l'enfonçant de force dans le col.

Noter le trait repère coïncidant avec l'extrémité inférieure de la colonne de matière grasse, puis, en ayant soin de ne pas bouger celle-ci, noter aussi rapidement que possible le trait repère coïncidant avec le point le plus bas du ménisque situé au sommet de la colonne de matière grasse ; cette lecture doit être faite à la moitié du plus petit échelon près (0,25 %).

Pendant les lectures, le butyromètre doit être tenu verticalement et l'œil doit être au niveau du point de lecture.

Note - Si la matière grasse est trouble ou de couleur foncée, ou s'il y a un dépôt noir ou blanc au bas de la colonne de matière grasse, la valeur obtenue pour la teneur en matière grasse ne sera pas exacte.

7. EXPRESSION DES RESULTATS

7.1 Mode de calcul

La teneur en matière grasse, exprimée en grammes pour 100 g de fromage, est égale à

$$B - A$$

Où

A: est la lecture faite à l'extrémité inférieure de la colonne de matière grasse ;

B : est la lecture faite à l'extrémité supérieure de la colonne de matière grasse.

7.2 Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même appareillage et dans un court intervalle de temps, ne dépassera pas une valeur correspondant à un échelon (0,5%).

ARRETES, DECISIONS ET AVIS

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 26 Ramadhan 1434 correspondant au 4 août 2013 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en matière grasse dans le lait.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 12-326 du 17 Chaoual 1433 correspondant au 4 septembre 2012 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 29 Safar 1414 correspondant au 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation ;

Vu l'arrêté interministériel du 7 Rabie Ethani 1418 correspondant au 10 août 1997 relatif aux spécifications techniques des laits concentrés non sucrés et sucrés et aux conditions et modalités de leur présentation ;

Vu l'arrêté interministériel du 13 Chaâbane 1419 correspondant au 2 décembre 1998 relatif aux spécifications techniques des laits en poudre et aux conditions et modalités de leur présentation ;

Vu l'arrêté du 17 Rajab 1420 correspondant au 27 octobre 1999, modifié et complété, relatif aux spécifications du lait en poudre industriel et aux conditions et modalités de sa présentation, son utilisation et sa commercialisation ;

Arrête :

Artticle 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de la teneur en matière grasse dans le lait.

Art. 2. — Pour la détermination de la teneur en matière grasse dans le lait, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne aémocratique et populaire.

Fait à Alger, le 26 Ramadhan 1434 correspondant au 4 août 2013.

Mustapha BENBADA.

— — — — — — — —

ANNEXE

Méthode de détermination de la teneur en matière grasse dans le lait méthode gravimétrique (méthode de référence)

La présente méthode spécifie une technique de référence pour la détermination de la teneur en matière grasse du lait de bonne qualité physicochimique. La méthode est applicable au lait cru de vache, de brebis et de chèvre, au lait allégé en matière grasse, au lait écrémé, au lait conservé chimiquement et au lait liquide ayant subi un traitement. Elle n'est pas applicable lorsqu'une plus grande précision est demandée pour le lait écrémé, par exemple pour connaître l'efficacité de l'opération d'écrémage.

Note - Cette méthode est habituellement dite Rose-Gottlieb.

1. DEFINITION

Pour les besoins de la présente méthode, le terme et la définition suivants s'appliquent.

Teneur en matière grasse du lait : fraction massique de substances, déterminée par la présente méthode et exprimée comme fraction massique et en pourcentage.

2. PRINCIPE

Une solution ammoniaco-éthanolique d'une prise d'essai est extraite au moyen d'oxyde diéthylique et d'éther de pétrole. Les solvants sont éliminés par distillation ou évaporation, puis la masse des substances extraites est déterminée.

3.RÉACTIFS

Sauf indication différente, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée, ou de l'eau de pureté, au moins, équivalente.

Les réactifs ne doivent pas laisser de résidu appréciable lorsque la détermination est effectuée selon la méthode spécifiée (7.2.2).

3.1 Hydroxyde d'ammonium, solution contenant une fraction massique NH_3 d'environ de 25 % (ρ 20 = 910 g/l).

Note - Si l'on ne dispose pas d'une solution d'hydroxyde d'ammonium à cette concentration, une solution plus concentrée, de concentration connue, peut être utilisée (7.4.1).

3.2 Éthanol (C_2H_5OH), ou éthanol dénaturé par du méthanol, contenant une fraction volumique d'éthanol d'au moins, 94% (A.5).

3.3 Solution de rouge-Congo

Dans une fiole jaugée de 100 ml (4.14), dissoudre dans de l'eau 1 g de rouge-Congo. Ajuster au trait avec de l'eau.

Note - L'utilisation de cette solution, qui permet de mieux voir l'interface entre le solvant et la couche aqueuse, est facultative (7.4.2). D'autres solutions aqueuses de colorants peuvent être utilisées pourvu qu'elles ne modifient pas le résultat de la détermination.

3.4 Oxyde diéthylique ($C_2H_5OC_2H_5$), exempt de péroxydes (A.3) et ne contenant pas plus de 2 mg/kg d'antioxydants, et conforme aux spécifications de l'essai à blanc (7.2.2, A.l) et (A.4).

Note - L'utilisation d'oxyde diéthylique comporte des risques. Des études sont en cours en vue de remplacer l'oxyde diéthylique par un autre réactif, à condition que celui-ci ne modifie pas le résultat final de la détermination.

3.5 Ether de pétrole, ayant un point d'ébullition compris entre 30° C et 60° C, en alternative, **pentane** (CH_3 $[CH_2]3$ CH_3) ayant un point d'ébullition de 36° C, conforme aux spécifications de l'essai à blanc (7.2.2, A.1 et A.4).

Note - Il est recommandé d'utiliser le pentane car il est d'une pureté plus élevée et de qualité constante.

3.6 Mélange de solvants, peu de temps avant l'emploi, mélanger des volumes égaux d'oxyde diéthylique (3.4) et d'éther de pétrole (3.5).

4. APPAREILLAGE

Note - La détermination impliquant l'utilisation de solvants volatiles inflammables, l'appareillage électrique utilisé doit être conforme à la législation concernant les risques d'utilisation de ces solvants.

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit.

4.1 Balance analytique, capable de peser à 1 mg près et avec une précision d'indication de 0,1 mg.

4.2 Centrifugeuse, dans laquelle les fioles ou les tubes d'extraction (4.6) peuvent être soumis à une rotation avec une fréquence de 500 tr/min à 600 tr/min, afin de produire une accélération radiale de 80 g à 90 g à l'extrémité extérieure des fioles ou des tubes.

Note - L'utilisation d'une centrifugeuse est facultative mais recommandée (7.4.5).

4.3 Appareil de distillation ou d'évaporation, permettant de distiller les solvants et l'éthanol des fioles, ou de les évaporer des béchers et des capsules (7.4.12) à une température n'excédant pas 100° C.

4.4 Étuve à dessiccation, à chauffage électrique, munie d'ouïes de ventilation complètement ouvertes et réglable à une température de 102° C ± 2° C dans l'espace utilisé.

L'étuve doit être munie d'un thermomètre approprié.

4.5 Bain d'eau, pouvant être maintenu à une température comprise entre 35° C et 40° C.

4.6 Fioles d'extraction de la matière grasse, type Mojonnier.

Note - On peut également utiliser des tubes d'extraction de la matière grasse munis d'un siphon ou d'un dispositif de lavage, mais le mode opératoire est alors différent et est décrit à la note B.

Les fioles doivent être munies de bouchons en liège de bonne qualité, ou en une autre matière inaltérable aux réactifs utilisés [par exemple, caoutchouc siliconé ou polytétrafluoroéthylène (PTFE)]. Les bouchons en liège doivent être lavés à l'oxyde diéthylique (3.4), maintenus dans l'eau à 60° C ou plus durant au moins 15 min et ensuite mis à refroidir dans l'eau de façon à en être imprégnés au moment de l'emploi.

4.7 Support, pour maintenir les fioles (ou les tubes) d'extraction de la matière grasse (4.6).

4.8 Flacon de lavage, approprié à l'utilisation avec le mélange de solvants (3.6).

Ne pas utiliser de flacon de lavage en plastique.

4.9 Récipients pour la récupération de la matière grasse, par exemple fioles à ébullition (fioles à fond plat) de l25 ml à 250 ml de capacité. fioles coniques de 250 ml de capacité ou capsules métalliques.

Si l'on utilise des capsules métalliques, elles doivent être de préférence en acier inoxydable, à fond plat et avoir un diamètre de 80 mm à 100 mm et une hauteur d'environ 50 mm.

4.10 Régularisateurs d'ébullition, exempts de matière grasse, en porcelaine non poreuse ou en carbure de silicium (facultatif si l'on utilise des capsules métalliques).

4.11 Eprouvettes graduées, de 5 ml et 25 ml capacité.

4.12 Pipettes, graduées, de 10 ml de capacité.

4.13 Pinces métalliques, appropriées pour tenir les fioles, les béchers ou les capsules.

4.14 Fioles jaugées, à un trait, de 100 ml de capacité.

5. ÉCHANTILLONNAGE

L'échantillonnage se fait dans des conditions appropriées.

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

Conserver tous les échantillons liquides, visqueux ou pâteux à une température comprise entre 2° C et 6° C à partir du moment de l'échantillonnage jusqu'au commencement du mode opératoire.

6. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON POUR ESSAI

Amener l'échantillon pour essai à une température de 38° C ± 2° C, en utilisant le bain d'eau (4.5). Bien mélanger l'échantillon, mais doucement, au moyen de retournements répétés du récipient, sans causer de mousse ou de barattage, puis refroidir rapidement l'échantillon pour essai à environ 20° C ± 2° C. Ne pas refroidir les échantillons de lait baratté, car ceux-ci doivent être pesés à une température située entre 30° C et 40° C (7.1).

S'il est possible d'obtenir un échantillon pour essai homogène sans préchauffage à une température de 38° C ± 2° C (par exemple pour les échantillons de lait écrémé), il convient de suivre le mode opératoire suivant.

Amener la température de l'échantillon pour essai à 20° C ± 2° C. Mélanger soigneusement afin d'assurer une répartition homogène de la matière grasse dans l'échantillon pour essai. Ne pas agiter trop vigoureusement, afin de ne pas causer de mousse de lait ni de barattage de la matière grasse.

Note - Il ne faut pas s'attendre à avoir une valeur correcte de la teneur en matière grasse :

a) si le lait est baratté ;

b) quand une odeur distincte d'acides gras libres est perceptible ;

c) si pendant ou après la préparation de l'échantillon pour essai, des particules blanches sont visibles sur les parois du récipient de l'échantillon ou si des gouttelettes de matière grasse flottent à la surface de l'échantillon.

7. MODE OPERATOIRE

Note 1 - S'il est demandé de vérifier que l'on satisfait aux exigences données en ce qui concerne la limite de répétabilité (9.2), effectuer deux déterminations séparées conformément à (7.1) à (7.4).

Note 2 - Un autre mode opératoire utilisant des tubes d'extraction de la matière grasse munis de siphon ou de dispositif de lavage (la note en 4.6) est décrit dans la note B.

7.1 Prise d'essai

Mélanger l'échantillon pour essai (point 6) en retournant doucement le récipient trois ou quatre fois. Peser immédiatement, à 1 mg près, directement ou par différence, dans une fiole d'extraction (4.6), 10 g à 11 g de l'échantillon pour essai.

La prise d'essai doit être placée aussi complètement que possible dans le bulbe inférieur (étroit) des fioles d'extraction.

7.2 Essais à blanc

7.2.1 Essai à blans pour la méthode

Effectuer un essai à blanc simultanément avec la détermination, en utilisant le même mode opératoire et les mêmes réactifs, mais en remplaçant la prise d'essai indiquée en 7.4.1 par 10 ml d'eau (A.2).

Lorsqu'un lot d'échantillons pour essai est analysé, le nombre de cycles de séchage peut varier entre des échantillons différents. Si un échantillon à blanc est utilisé pour le lot entier, s'assurer que la valeur à blanc utilisée dans le calcul de la teneur en matière grasse d'un échantillon individuel a été obtenue dans les mêmes conditions que l'échantillon pour essai individuel.

Si la valeur obtenue pour l'essai à blanc dépasse régulièrement 1,0 mg, vérifier les réactifs si cela n'a pas été fait récemment (7.2.2). Les corrections faites pour des valeurs supérieures à 2,5 mg doivent figurer dans le bulletin d'analyse.

7.2.2 Essai à blanc pour les réactifs

Pour vérifier la qualité des réactifs, effectuer un essai à blanc comme mentionné en (7.2.1). En outre, pour les contrôles de masses, utiliser un récipient de récupération de la matière grasse vide, préparé comme spécifié en (7.3). Les réactifs ne doivent pas laisser de résidus supérieur à 1,0 mg (A.1).

Si les résidus des réactifs de l'essai à blanc complet sont supérieurs à 1,0 mg, déterminer les résidus des solvants séparément en distillant respectivement 100 ml d'oxyde diéthylique (3.4) et d'éther de pétrole (3.5). Utiliser un récipient de contrôle vide pour obtenir la masse réelle de résidus qui ne doit pas être supérieure à 1,0 mg.

Il peut arriver que les réactifs contiennent des matières volatiles qui sont fortement retenues dans la matière grasse. S'il y a des indications de la présence de telles substances, effectuer des essais à blanc sur tous les réactifs et pour chaque solvant, en utilisant pour chacun un récipient pour la matière grasse, avec environ 1 g de matière grasse du beurre anhydre. Si nécessaire, distiller à nouveau les solvants en présence de 1 g de matière grasse du beurre anhydre pour 100 ml de solvant. Utiliser les solvants juste après redistillation.

Remplacer les réactifs ou solvants non satisfaisants, ou redisliller les solvants.

7.3 Préparation du récipient pour la récupération de la matière grasse

Sécher, pendant 1 h, un récipient (4.9) avec quelques régularisateurs d'ébullition (4.10) à l'étuve (4.4) réglée à 102° C ± 2° C.

Note 1 - Les régularisateurs d'ébullition sont recommandés pour permettre une ébullition modérée au cours de l'élimination ultérieure des solvants, notamment dans le cas de récipients en verre; leur utilisation est facultative dans le cas de capsules métalliques.

Protéger le récipient des poussières et le laisser refroidir à la température de la salle des balances (récipients en verre pendant au moins 1 h, capsules métalliques pendant au moins 30 min).

Note 2 - Pour éviter un refroidissement insuffisant ou des périodes de refroidissement exagérément prolongées, il convient que le récipient ne soit pas placé dans un dessiccateur.

A l'aide de pinces (4.13), placer le récipient sur la balance. Peser, à 1,0 mg près, le récipient pour la récupération de la matière grasse.

Note 3 - Il convient d'utiliser de préférence des pinces pour éviter, en particulier, des variations de température.

7.4 Détermination

7.4.1 Débuter la détermination dans un délai de 1 h suivant le pesage de l'échantillon.

Ajouter 2 ml de solution d'hydroxyde d'ammonium (3.1) à la prise d'essai (7.1) se trouvant dans la fiole d'extraction, ou un volume équivalent d'une solution plus concentrée (note 3.1). Mélanger vigoureusement avec la prise d'essai dans le bulbe étroit de la fiole.

7.4.2 Ajouter 10 ml d'éthanol (3.2). Mélanger doucement, mais à fond, en laissant le contenu de la fiole aller et venir entre les deux bulbes. Éviter d'amener le liquide trop près du col de la fiole.

Ajouter, si nécessaire, 2 gouttes de solution de rouge-Congo (3.3). Si nécessaire, refroidir de nouveau la fiole à la température ambiante.

7.4.3 Ajouter 25 ml d'oxyde diéthylique (3.4), Boucher la fiole avec un bouchon en liège saturé d'eau, ou avec un bouchon d'une autre matière (4.6), mouillé avec de l'eau. Agiter la fiole vigoureusement pendant 1 min, mais sans excès afin d'éviter la formation d'émulsions persistantes.

Lors de l'agitation, maintenir la fiole en position horizontale, le bulbe étroit étant en haut, en laissant de temps en temps le liquide du bulbe large passer dans le bulbe étroit. Si nécessaire, refroidir la fiole à l'eau courante jusqu'à température ambiante. Retirer avec précaution le bouchon en liège ou le dispositif de fermeture et le rincer, ainsi que le col de la fiole, avec une petite quantité de mélange de solvants (3.6). Utiliser un flacon de lavage (4.8), de façon que les liquides de rinçage coulent dans la fiole.

7.4.4 Ajouter 25 ml d'éther de pétrole (3.5). Boucher la fiole avec le bouchon en liège réhumidifié, ou l'autre bouchon réhumidifié (en le trempant dans l'eau), et agiter à nouveau doucement la fiole pendant 30 s comme décrit en (7.4.2). Poursuivre en agitant comme décrit en (7.4.3).

7.4.5 Centrifuger (4.2) la fiole bouchée pendant 1 min à 5 min avec une accélération radiale de 80 g à 90 g. Si l'on ne dispose pas de centrifugeuse, laisser la fiole bouchée reposer sur le support (4.7) pendant, au moins, 30 min, jusqu'à ce que la couche surnageante soit claire et nettement séparée de la couche aqueuse. Si nécessaire, refroidir la fiole à l'eau courante jusqu'à température ambiante.

7.4.6 Enlever avec précaution le bouchon en liège ou le dispositif de fermeture et le rincer, ainsi que l'intérieur du col de la fiole, avec un peu de mélange de solvants (3.6). Utiliser un flacon de lavage (4.8) de façon que les liquides de rinçage coulent dans la fiole. Si l'interface se situe au-dessous du fond du col de la fiole, la faire monter à ce niveau en ajoutant doucement de l'eau par le côté de la fiole (Figure 1), afin de permettre la décantation du solvant.

Note - Dans les Figures 1 et 2, il a été choisi l'un parmi les trois types de flacons spécifiés selon les standards internationaux.

7.4.7 Tenir la fiole d'extraction par le bulbe étroit, décanter avec soin le plus possible de la couche surnageante dans le récipient préparé, destiné à la récupération de la matière grasse (7.3), contenant quelques régularisations d'ébullition (4.10) dans le cas des fioles (facultatif avec les capsules métalliques). Eviter de décanter une partie quelconque de la couche acqueuse (figure 2).

7.4.8 Rincer l'extérieur du col de la fiole d'extraction avec un peu de mélange de solvants (3.6). Recueillir les liquides de rinçage dans le récipient pour la récupération de la matière grasse. Prendre soin que le mélange de solvants ne soit pas projeté sur l'extérieur de la fiole d'extraction. Si nécessaire, éliminer le solvant totalement ou partiellement du récipient par distillation ou évaporation comme décrit en (7.4.12).

7.4.9 Ajouter 5 ml d'éthanol (3.2) au contenu de la fiole d'extraction. Utiliser de l'éthanol pour rincer l'intérieur du col de la fiole et mélanger comme décrit en (7.4.2).

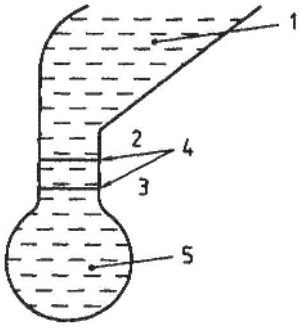
7.4.10 Effectuer une seconde extraction en recommençant les opérations décrites de 7.4.3 à 7.4.7 inclus, mais en utilisant au lieu de 25 ml, seulement 15 ml d'oxyde diéthylique (3.4) et 15 ml d'éther de pétrole (3.5). Utiliser également l'oxyde diéthylique pour rincer l'intérieur du col de la fiole d'extraction.

Si nécessaire, faire monter l'interface au milieu du col de la fiole d'extraction en ajoutant doucement de l'eau par le col de la fiole (Figure 1) pour permettre à la décantation finale des solvants d'être aussi complète que possible (Figure 2).

7.4.11 Effectuer une troisième extraction, sans addition d'éthanol, en répétant de nouveau les opérations décrites de (7.4.3) à (7.4.7) inclus, mais en utilisant de nouveau seulement 15 ml d'oxyde diéthylique (3.4) et 15 ml d'éther de pétrole (3.5). Utiliser l'oxyde diéthylique pour rincer l'intérieur du col de la fiole d'extraction.

Si nécessaire, faire monter l'interface au milieu du col de la fiole d'extraction en ajoutant doucement de l'eau par le col de la fiole (Figure 1) pour permettre à la décantation finale des solvants d'être aussi complète que possible (Figure 2).

Figure 1 - Avant décantation



Légende

1 : Solvants

2 : A la seconde et troisième extraction

3 : A la première extraction

4 : Interface

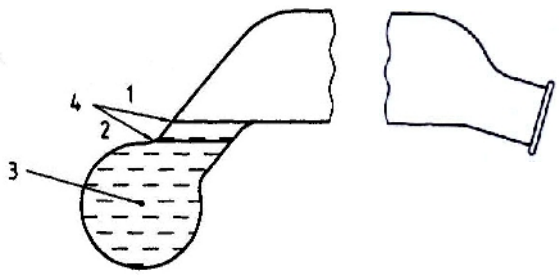
5 : Couche aqueuse

Note - La troisième extraction n'est pas nécessaire pour du lait ayant une teneur en matière grasse inférieure à 0,5 %.

7.4.12 Éliminer les solvants (éthanol compris) aussi complètement que possible par distillation si l'on utilise une fiole, ou par évaporation si l'on utilise un bécher ou une capsule (4.3). Rincer l'intérieur du col de la fiole avec un peu de mélange de solvants (3.6) avant de commencer la distillation.

7.4.13 Chauffer pendant 1 h, dans l'étuve à dessiccation (4.4) réglée à 102° C ± 2° C, le récipient pour la récupération de la matière grasse, la fiole étant placée en position inclinée afin de permettre aux vapeurs de solvants de s'échapper. Enlever le récipient pour la récupération de la matière grasse de l'étuve et vérifier immédiatement si la matière grasse est claire ou non. Si la matière grasse n'est pas claire on peut supposer qu'il y a présence d'une matière grasse étrangère et l'ensemble de la détermination doit être refait.

Figure 2 - Après décantation



Légende

1: A la seconde et troisième extraction

2: À la première extraction

3: Couche aqueuse

4: Interface

Si la matière grasse est claire, protéger le récipient collecteur de la poussière et le laisser refroidir (pas dans un dessiccateur) à la température de la salle des balances (récipient en verre pendant, au moins, 1 h, capsule métallique pendant au moins 30 min).

Ne pas essuyer le récipient juste avant la pesée. Placer le récipient sur la balance au moyen d'une paire de pinces (4.13). Peser le récipient pour la récupération de la matière grasse à 1,0 mg près.

7.4.14 Chauffer pendant 30 min supplémentaires, dans l'étuve à dessiccation (4.4) réglée à 102° C ± 2° C, le récipient pour la récupération de la matière grasse, la fiole étant placée en position inclinée afin de permettre aux vapeurs de solvants de s'échapper. Répéter les opérations de pesée décrites en (7.4.13), jusqu'à ce que la masse du récipient d'extraction de la matière grasse diminue de 1,0 mg ou moins, ou augmente, entre deux pesées successives. Noter la masse minimale comme étant la masse du récipient d'extraction de la matière grasse et de la matière extraite.

8. CALCUL ET EXPRESSION DES RESULTATS

8.1 Calcul

Calculer la teneur en matière grasse de l'échantillon à l'aide de l'équation suivante :

$$W_f = \frac{(m_1 - m_2)-(m_3 - m_4)}{m_0} \times 100\ \%$$

Où

W_f : est la fraction massique, en pourcentage, de la matière grasse dans l'échantillon ;

m_0 : est la masse, en grammes, de la prise d'essai (7.1) ;

m_1 : est la masse, en grammes, du récipient pour la récupération de la matière grasse et de la matière extraite déterminée en (7.4.14) ;

m_2 : est la masse, en grammes, du récipient pour la récupération de la matière grasse (7.3) ;

m_3 : est la masse, en grammes, du récipient pour la récupération de la matière grasse utilisé pour l'essai à blanc (7.2) et de la matière extraite, déterminée en (7.4.14) ;

m_4 : est la masse, en grammes, du récipient pour la récupération de la matière grasse (7.3) utilisé pour l'essai à blanc (7.2).

8.2 Expression des résultats

Arrondir le résultat à deux décimales.

9 Fidélité

9.1 Essai interlaboratoires

Les valeurs de répétabilité et de reproductibilité sont exprimées au niveau de probabilité de 95 % et peuvent ne pas s'appliquer aux plages de concentrations ou matrices autres que celles données.

9.2 Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même appareillage dans un court intervalle de temps, n'excèdera que dans 5 % des cas, au plus, les valeurs suivantes relatives à la fraction massique de matière grasse :

— 0,031 % pour le lait de vache écrémé ;

— 0,036 % pour le lait de vache allégé en matière grasse ;

— 0,043 % pour le lait de vache entier ;

— 0,030 % pour le lait de chèvre ;

— 0,069 % pour le lait de brebis.

9.3 Reproductibilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans des laboratoires différents par des opérateurs différents utilisant des appareillages différents, n'excédera que dans 5 % des cas, au plus, les valeurs suivantes relatives à la fraction massique de matière grasse:

— 0,043 % pour le lait de vache écrémé ;

— 0,042 % pour le lait de vache allégé en matière grasse ;

— 0,056 % pour le lait de vache entier ;

— 0,052 % pour le lait de chèvre ;

— 0,096 % pour le lait de brebis.

NOTE A

Indication sur les modes opératoires

A.1 Essai à blanc pour contrôler les réactifs (7.2.2)

Dans cet essai à blanc, un récipient de contrôle de la masse doit être utilisé de façon que les changements des conditions atmosphériques de la salle des balances ou les effets de la température du récipient de récupération de la matière grasse ne révèlent pas faussement la présence ou l'absence des matières non volatiles dans l'extrait des réactifs. Ce récipient peut être utilisé comme un contrepoids dans le cas d'une balance à plateaux. Par ailleurs, il convient que les écarts de la masse apparente (m_3 - m_4 en 8.1) du récipient de contrôle soient retenus lors du contrôle de la masse du récipient de récupération de la matière grasse utilisé pour l'essai à blanc. Par conséquent, le changement de masse apparente du récipient de récupération de la matière grasse, corrigé du changement apparent de masse du récipient de contrôle, ne doit pas être supérieur à 1,0 mg.

Il peut arriver que les solvants contiennent des matières volatiles qui sont fortement retenues dans la matière grasse. S'il y a des indications de la présence de telles substances, effectuer des essais à blanc sur tous les réactifs et pour chaque solvant, en utilisant pour chacun un récipient pour la matière grasse, avec environ 1 g de matière grasse du beurre anhydre. Si nécessaire, distiller à nouveau les solvants en présence de 1 g de matière grasse du beurre anhydre pour 100 ml de solvant. Utiliser les solvants juste après redistillation,

A.2 Essai à blanc effectué en même temps que la détermination (7.2.1)

La valeur obtenue dans l'essai à blanc, effectué parallèlement à la détermination, permet de corriger la masse apparente des substances extraites à partir de la prise d'essai (m_1 - m_2) par rapport aux matières non volatiles venant des réactifs et également des changements de conditions atmosphériques de la salle des balances et des différences de températures entre le récipient de matière grasse et la salle des balances, lors des deux pesées (7.4.14) et (7.3).

Dans les conditions favorables (valeur faible dans l'essai à blanc sur les réactifs, température stable de la salle des balances, temps de refroidissement suffisant pour le récipient de matière grasse), la valeur sera généralement inférieure à 1,0 mg et pourra alors ne pas être prise en compte dans le calcul, dans le cas de déterminations de routine. On rencontre assez souvent des valeurs (positives et négatives) légèrement supérieures jusqu'à 2,5 mg.

Après correction de ces valeurs, les résultats seront encore précis. Quand les corrections d'une valeur supérieure à 2,5 mg sont appliquées, il convient d'en faire mention dans le bulletin d'analyse.

Si la valeur obtenue dans l'essai à blanc dépasse régulièrement 1,0 mg, il convient de contrôler les réactifs si cela n'a pas été fait récemment. Il convient que les réactifs impurs ou ayant des traces soient remplacés ou purifiés (7.2.2) et (A. 1).

A.3 Contrôle pour vérifier la présence de peroxydes

Pour vérifier la présence de peroxydes, ajouter 1 ml d'une solution d'iodure de potassium à 100 g/l récemment préparée, à 10 ml d'oxyde diéthylique, dans une petite éprouvette munie d'un bouchon en verre, et préalablement rincée avec un peu d'oxyde diéthylique. Agiter et laisser reposer pendant 1 min. Il convient qu'aucune coloration jaune ne soit constatée dans l'une ou l'autre des deux couches.

D'autres méthodes peuvent être utilisées pour contrôler la présence de peroxydes.

Pour être sûr que l'oxyde diéthylique est exempt de peroxydes, et en reste exempt, traiter l'oxyde diéthylique comme ci-dessous, au moins, 3 jours avant son utilisation.

Couper du zinc en feuille, en bandes pouvant atteindre, au moins, le milieu du récipient contenant l'oxyde diéthylique, en utilisant, environ, 80 cm^2 de feuille de zinc par litre d'oxyde diéthylique.

Avant utilisation, immerger totalement les bandes pendant 1 min dans une solution contenant 10 g de sulfate de cuivre(II) pentahydraté ($CuS0_4,5H_20$) et 2 ml/1 d'acide sulfurique concentré (fraction massique de 98 %).

Laver doucement et avec soin les bandes à l'eau, introduire les bandes humides traitées au cuivre dans le récipient contenant l'oxyde diéthylique et laisser les bandes dans le récipient.

D'autres méthodes peuvent être utilisées pourvu qu'elles ne modifient pas le résultat de la détermination.

A.4 Oxyde diéthylique contenant des antioxydants

L'oxyde diéthylique contenant environ 1 mg/kg d'antioxydants est disponible dans certains pays, en particulier pour des déterminations de matière grasse. Cette teneur n'exclut pas son emploi à titre de référence.

Dans d'autres pays, l'oxyde diéthylique pourra avoir des teneurs plus élevées en antioxydants, par exemple jusqu'à 7 mg/kg. Dans ce cas, il ne sera utilisé que pour des déterminations de routine, avec un essai à blanc obligatoire effectué simultanément avec les déterminations, afin de corriger les erreurs systématiques dues aux résidus d'antioxydants.

S'il est employé à titre de référence, il devra toujours être distillé avant l'emploi.

A.5 Ethanol

L'éthanol dénaturé autrement que par ajout de méthanol peut être utilisé, pourvu que l'agent dénaturant n'affecte pas les résultats de la détermination.

NOTE B

Autre mode opératoire utilisant des tubes d'extraction de la matière grasse munis d'un siphon ou d'un dispositif de lavage

B.I Généralités

Si l'on emploie des tubes d'extraction de la matière grasse munis d'un siphon ou d'un dispositif de lavage, utiliser le mode opératoire spécifié dans la présente annexe. Les tubes doivent être munis de bouchons en liège de bonne qualité ou de bouchons tels que spécifiés pour les fioles en (4.6) (Figure B.l).

B.2 Mode opératoire

B.2.1 Préparation de l'échantillon pour essai (6).

B.2.2 Prise d'essai

Procéder comme spécifié en (7.1), mais en utilisant les tubes d'extraction de la matière grasse (note en 4.6) et (Figure B.1).

La prise d'essai doit être transférée aussi complètement que possible au fond du tube d'extraction.

B.2.3 Essai à blanc (7.2) et (A.2).

B.2.4 Préparation du récipient pour la récupération de la matière grasse (7.3).

B.2.5 Détermination

B.2.5.1 Effectuer la détermination sans attendre. Ajouter 2 ml de solution d'hydroxyde d'ammonium (3.1) à la prise d'essai (B.2.2) se trouvant dans le tube d'extraction de matière grasse, ou un volume équivalent d'une solution plus concentrée (note 3.1). Mélanger vigoureusement avec la prise d'essai dans le fond du tube.

B.2.5.2 Ajouter 10 ml d'éthanol (3.2). Mélanger doucement mais complètement avec le mélange au fond du tube. Ajouter, si on le désire, 2 gouttes de solution rouge-Congo (3.3).

B.2.5.3 Ajouter 25 ml d'oxyde diéthylique (3.4). Fermer le tube avec un bouchon en liège saturé d'eau, ou avec un bouchon d'une autre matière (4.6), mouillé avec de l'eau. Agiter le tube vigoureusement, mais sans excès, afin d'éviter la formation d'émulsions persistantes par des retournements répétés pendant 1 min. Si nécessaire, refroidir le tube à l'eau courante jusqu'à température ambiante. Retirer avec précaution le bouchon en liège ou le dispositif de fermeture et le rincer, ainsi que le col du tube, avec une petite quantité de mélange de solvants (3.6). Utiliser le flacon de lavage (4.8) de façon que les liquides de rinçage coulent dans le tube.

B.2.5.4 Ajouter 25 ml d'éther de pétrole (3.5). Fermer le tube avec le bouchon en liège réhumidifié ou avec l'autre bouchon réhumidifié (en le trempant dans l'eau). Agiter doucement le tube pendant 30s, comme décrit en (B.2.5.3).

B.2.5.5 Centrifuger (4.2) le tube fermé pendant 1 min à 5 min avec une accélération radiale de 80 g à 90 g. Si l'on ne dispose pas de centrifugeuse, laisser le tube bouché reposer sur le support (4.7) pendant, au moins, 30 min, jusqu'à ce que la couche surnageante soit claire et nettement séparée de la couche aqueuse. Si nécessaire, refroidir le tube à l'eau courante jusqu'à température ambiante.

B.2.5.6 Retirer avec précaution le bouchon en liège ou le dispositif de fermeture et le rincer, ainsi que le col du tube, avec une petite quantité de mélange de solvants (3.6). Utiliser le f1acon de lavage (4.8) de façon que les liquides de rinçage coulent dans le tube.

B.2.5.7 Introduire un siphon ou un dispositif de lavage dans le tube. Enfoncer la longue tubulure à l'intérieur jusqu'à ce que l'orifice soit à environ 4 mm au-dessus de l'interface des couches. La tubulure intérieure doit être parallèle à l'axe central du tube d'extraction.

Transvaser avec précaution la couche surnageante du tube dans le récipient pour la récupération de la matière grasse (7.3) contenant quelques régularisateurs d'ébullition (4.10) dans le cas des fioles (facultatif avec les capsules métalliques). Éviter de décanter une partie quelconque de la couche aqueuse. Rincer l'orifice avec une petite quantité de mélange de solvants, en recueillant les liquides de rinçage dans le récipient pour la récupération de la matière grasse.

Note - La couche surnageante peut être transférée du tube d'extraction de la matière grasse, en utilisant, par exemple, un bulbe en caoutchouc relié à la tige courte afin d'assurer la pression.

B.2.5.8 Desserrer le dispositif du col du tube. Le soulever légèrement et rincer la partie inférieure de la longue tubulure interne avec un peu de mélange de solvants (3.6). Abaisser et réintroduire le dispositif et transvaser les liquides de rinçage dans le récipient de récupération de la matière grasse.

Rincer l'orifice externe du dispositif avec un peu de mélange de solvants et recueillir les liquides de rinçage dans le récipient. Si on le désire, le solvant ou une partie du solvant peut être enlevé du récipient, par distillation ou évaporation, comme décrit en (7.4.13).

B.2.5.9 Desserrer de nouveau le dispositif du col. Le soulever légèrement et ajouter 5 ml d'éthanol dans le tube. Utiliser l'éthanol pour rincer la longue tubulure interne. Mélanger comme décrit en (B.2.5.2).

B.2.5.10 Effectuer une seconde extraction en répétant les opérations décrites de (B.2.5.3) à (B.2.5.8), mais en utilisant seulement 15 ml d'oxyde diéthylique (3.4) et 15 ml d'éther de pétrole (3.5). Utiliser l'oxyde diéthylique pour rincer la longue tubulure interne pendant que l'on retire le dispositif du tube après l'extraction précédente.

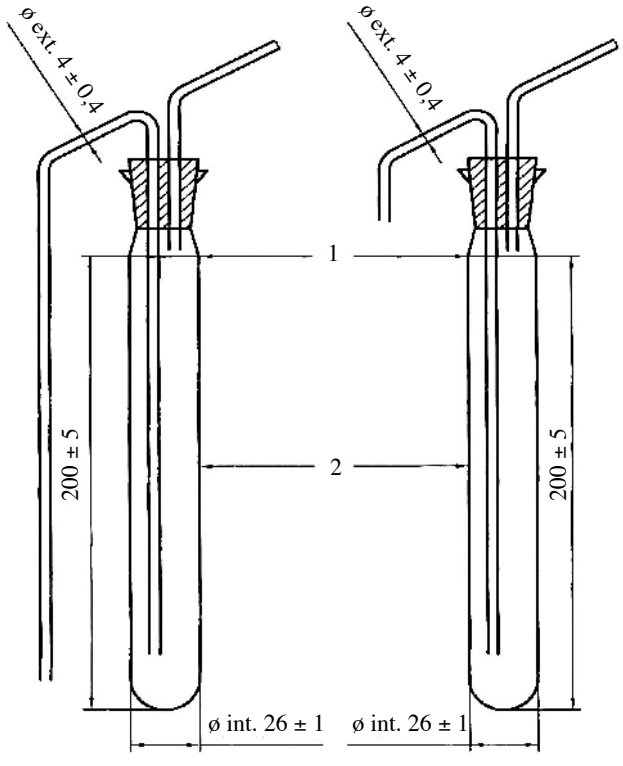
B.2.5.11 Effectuer une troisième extraction, sans addition d'éthanol, en répétant à nouveau les opérations décrites de (B.2.5.3) à (B.2.5.8), mais en utilisant de nouveau seulement 15 ml d'oxyde diéthylique et 15 ml d'éther de pétrole et en rinçant la longue tubulure située à l'intérieur du dispositif, comme décrit en (B.2.5.10).

Note - La troisième extraction n'est pas nécessaire pour du lait ayant une teneur en matière grasse inférieure à 0,5 %.

B.2.5.12 Poursuivre la détermination comme décrit de (7.4.12) à (7.4.14).

Figure B.1 - Exemples de tubes d'extraction pour matière grasse

a) avec siphon **b) avec système d'aspiration par le vide**



Légende

1. Capacité maximale, avec siphon ou système d'aspiration par le vide retiré, 105 ml ± 5 ml.

2. Epaisseur de la paroi 1,5 mm ± 0,5 mm.

ARRETES, DECISIONS ET AVIS

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 20 Chaoual 1434 correspondant au 27 août 2013 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en azote dans le lait.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 12-326 du 17 Chaoual 1433 correspondant au 4 septembre 2012 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 29 Safar 1414 correspondant au 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation ;

Vu l'arrêté interministériel du 7 Rabie Ethani 1418 correspondant au 10 Août 1997 relatif aux spécifications techniques des laits concentrés non sucrés et sucrés et aux conditions et modalités de leur présentation ;

Arrête :

Article ler. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de la teneur en azote dans le lait.

Art. 2. — Pour la détermination de la teneur en azote dans le lait, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 20 Chaoual 1434 correspondant au 27 août 2013.

Mustapha BENBADA.

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE LA TENEUR EN AZOTE DANS LE LAIT

La présente méthode spécifie une technique pour la détermination de la teneur en azote du lait liquide, entier ou écrémé, selon le principe de (kjeldahl).

1. DEFINITION

Pour les besoins de la présente méthode, la définition suivante s'applique :

Teneur en azote :

Rapport de masse d'azote déterminé par le mode opératoire décrit dans la présente méthode.

Note - La teneur en azote est exprimée sous forme de pourcentage en masse.

2. PRINCIPE

Minéralisation d'une prise d'essai avec un mélange d'acide sulfurique concentré et de sulfate de potassium, en utilisant du sulfate de cuivre (II) (3.2) comme catalyseur pour convertir ainsi l'azote organique présent en sulfate d'ammonium. (La fonction du sulfate de potassium est d'élever le point d'ébullition de l'acide sulfurique et de permettre d'obtenir un mélange oxydant plus fort pour la minéralisation). Addition d'hydroxyde de sodium excédentaire au minéralisat refroidi pour libérer de l'ammoniac. Distillation de l'ammoniac libéré dans un excédent de solution d'acide borique, puis titrage en utilisant de l'acide chlorhydrique. Calcul de la teneur en azote à partir de la quantité d'ammoniac produite.

3. REACTIFS

Sauf indication différente, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée, ou de l'eau de pureté, au moins, équivalente.

3.1 Sulfate de potassium (K_2SO_4), exempt d'azote.

3.2 Solution de sulfate de cuivre (II), c ($CuSO_4$) = 5,0 g par 100 ml.

Dans une fiole jaugée de 100 ml, dissoudre 5,0 g de sulfate de cuivre (Il) pentahydraté ($CuSO_4,5H_2O$) dans de l'eau. Diluer jusqu'au repère avec de l'eau, puis mélanger.

3.3 Acide sulfurique (H_2SO_4), avec un rapport de masse compris entre 95 % et 98 %, sans azote (P20 = environ 1,84 g/ml).

3.4 Solution d'hydroxyde de sodium (NaOH), exempte d'azote, contenant 50 g d'hydroxyde de sodium par 100 g de solution.

3.5 Solution indicatrice

Dissoudre 0,1 g de rouge de méthyle dans de l'éthanol à 95 % (rapport de volume) et diluer à 50 ml avec de l'éthanol. Dissoudre 0,5 g de vert de bromocrésol dans de l'éthanol à 95 % (rapport de volume) et diluer à 250 ml avec de l'éthanol. Mélanger une dose de la solution de rouge de méthyle à cinq doses de la solution de vert de bromocrésol ou combiner et mélanger l'ensemble des deux solutions.

3.6 Solution d'acide borique, c(H_3BO_3)= 40,0 g/l.

Dans une fiole jaugée de 1000 ml, dissoudre 40,0 g d'acide borique dans 1 litre d'eau chaude. Laisser refroidir la fiole et son contenu à 20 °C. Compléter au volume avec de l'eau, ajouter 3 ml de la solution indicatrice (3.5) et mélanger.

Remarque

Conserver la solution, qui doit être orange clair, dans une bouteille en verre de borosilicate. Durant le stockage, protéger la solution de la lumière et des sources de vapeurs d'ammoniac.

En cas de titrage électronique du pH avec point final, l'ajout de la solution indicatrice à la solution d'acide borique peut être omis. D'autre part, le changement de couleur peut aussi servir à contrôler le mode opératoire de titrage.

3.7 Solution volumétrique standard d'acide chlorhydrique, c(HCI) = (0,1 ± 0,000 5) mol/l.

Il est recommandé d'acheter ce matériau déjà prénormalisé, répondant à ces spécifications.

Note - Souvent, les erreurs systématiques (qui peuvent être évitées) introduites par un analyste qui dilue un acide concentré, puis détermine la molarité de l'acide, peuvent diminuer la reproductibilité de la méthode.

Il convient que l'analyste n'utilise pas de solution de titrage de concentration supérieure à 0,1 mol/l car cela réduirait le volume total de titrage par échantillon, et l'incertitude de lecture de la burette représenterait un pourcentage plus élevé de la valeur.

Cela aura un impact négatif sur la répétabilité et la reproductibilité de la méthode. Les mêmes problèmes se posent, avec le risque d'erreurs supplémentaires, lorsqu'un autre acide (par exemple l'acide sulfurique) est substitué à l'acide chlorhydrique, Ces substitutions ne sont donc pas recommandées.

3.8 Sulfate d'ammonium [$(NH_4)_2$ SO_4)], ayant une pureté minimale de 99,9 % (rapport de masse) sur matière sèche.

Immédiatement avant l'emploi, sécher le sulfate d'ammonium à 102°C ± 2°C pendant, au moins, 2 h. Laisser refroidir à température ambiante dans un dessiccateur.

3.9.Tryptophane ($C_{11}H_{12}N_2O_2$) ou **hydrochlorure** de lysine ($C_6H_{15}CIN_2O_2$), ayant une pureté minimale de 99,9 % (rapport de masse).

Ne pas sécher ces réactifs dans une étuve avant l'emploi.

3.10 Saccharose, dont la teneur en azote est inférieure à 0,002 % (fraction massique).

Ne pas sécher la saccharose dans une étuve avant l'emploi.

4. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit.

4.1 Bain d'eau, pouvant être maintenu à une température de 38°C ± 2 °C.

4.2 Ballons de Kjeldahl, d'une capacité de 500 ml ou 800 ml.

4.3 Balance analytique, permettant de peser à 0,1 mg près.

4.4 Corps facilitant l'ébullition, par exemple pierre ponce incandescente, poussière de zinc, pièces de porcelaine dures ou granules d'alundon amphotères (carbarundum) lisses, d'une pureté élevée et d'une taille de mailles de 10.

Ne pas réutiliser ces corps.

Note- Des billes de verre d'environ 5 mm de diamètre sont parfois utilisées, mais celles-ci peuvent être moins efficaces pour l'ébullition que les granules d'alundon, et des problèmes de formation de mousse pendant la minéralisation risquent davantage de se poser avec les billes de verre.

4.5 Burette ou **pipette automatique,** permettant d'obtenir des doses de 1,0 ml de solution de sulfate de cuivre (Il) (3.2).

4.6 Eprouvettes graduées, d'une capacité de 50 ml, 100 ml et 500 ml.

4.7 Appareil de minéralisation, pour maintenir les ballons de Kjeldahl (4.2) en position inclinée (à environ 45°), pourvu de résistances électriques ou de becs à gaz ne chauffant pas les ballons au-delà du niveau de leur contenu, ainsi que d'un système d'évacuation des fumées.

Il convient que la source chauffante soit réglable pour permettre de contrôler le réglage maximal de l'élément chauffant à appliquer durant la minéralisation. Préchauffer la source chauffante au réglage de l'élément chauffant à évaluer.

La durée de préchauffage doit être de 10 min dans le cas d'un bec à gaz et de 30 min dans le cas d'un élément chauffant électrique. Déterminer, pour chacun des éléments chauffants, le réglage qui permet de porter à ébullition 250 ml d'eau et 5 à 10 corps facilitant l'ébullition (en partant d'une température initiale de 25°C) en 5 min à 6 min. Ce réglage correspond au réglage maximal de l'élément chauffant à appliquer durant la minéralisation.

4.8 Appareil de distillation, en verre de borosilicate ou autre matière appropriée, pouvant être équipé d'un ballon de Kjeldahl (4.2), se composant d'une tête anti projections efficace, relié à un condenseur efficace avec tube intérieur droit et un tube d'écoulement fixé à son extrémité inférieure.

Le tubage de connexion et le (s) bouchon (s) doivent être étanches et de préférence en néoprène.

4.9 Fioles coniques, d'une capacité de 500 ml, graduées tous les 200 ml.

4.10 Burette, d'une capacité de 50 ml, graduée, au moins, tous les 0,01 ml.

Il est également possible d'utiliser une burette automatique satisfaisant aux mêmes exigences.

4.11 Dispositif de titrage automatique pourvu d'un pH-mètre.

Il convient que le PH-mètre soit correctement étalonné dans la gamme de pH 4 à PH 7 selon les méthodes normales d'étalonnage de PH en laboratoire

5. ECHANTILLONNAGE

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif et n'ayant pas été endommagé ou modifié durant le transport ou le stockage. L'échantillonnage se fait selon une méthode appropriée.

6. PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI

Chauffer l'échantillon pour essai dans le bain d'eau (4.1) réglé à 38 °C ± 2 °C. Bien mélanger, mais délicatement, au moyen de retournements répétés du récipient, sans causer ni mousse ni barattage. Laisser refroidir l'échantillon à température ambiante immédiatement avant de peser la prise d'essai (7.1).

Note - Si l'on souhaite appliquer cette méthode à des produits laitiers autres que le lait, voir la remarque annexée à la présente méthode pour des recommandations sur la taille de l'échantillon pour essai.

7. MODE OPERATOIRE

7.1 Prise d'essai et prétraitement

Introduire dans le ballon de Kjeldahl (4.2) propre et sec de 5 à 10 corps facilitant l'ébullition (4.4), 15,0g de sulfate de potassium (3.1), 1,0 ml de solution de sulfate de cuivre (II) (3.2), environ 5 ml ± 0,1 ml de l'échantillon pour essai préparé (6), pesé à 0,1 mg près, et 25 ml d'acide sulfurique (3.3). A cet effet, utiliser l'acide sulfurique pour entraîner tout résidu de la solution de sulfate de cuivre (II) (3.2), du sulfate de potassium ou de la prise d'essai restant sur le col du ballon.

S'il reste un peu de minéralisat brûlé sur le col, rincer avec une petite quantité d'eau. Mélanger doucement le contenu du ballon de Kjeldahl.

7.2 Détermination

7.2.1 Minéralisation

Brancher le système d'évacuation des fumées de l'appareil de minéralisation (4.7) avant de commencer la minéralisation. Chauffer le ballon de Kjeldahl et son contenu (7.1) sur l'appareil de minéralisation en réglant l'élément chauffant sur une température suffisamment basse pour que le minéralisat brûlé ne déborde pas en moussant par le col du ballon de Kjeldahl. Effectuer la minéralisation à ce réglage de l'élément chauffant jusqu'à ce que de la fumée blanche apparaisse dans le ballon au bout d'environ 20 min. Augmenter le réglage de l'élément chauffant jusqu'à une position correspondant à la moitié du réglage maximal déterminé en (4.7) et continuer le chauffage pendant 15 min. Au terme des 15 min, augmenter le chauffage jusqu'au réglage maximal déterminé en (4.7). Une fois que le minéralisat s'est éclairci (il devient transparent avec une coloration bleu clair à vert), continuer à faire bouillir le contenu pendant 1 h à 1 h 30 min au réglage maximal. Si le liquide ne bout pas, il est possible que le réglage final du bec à gaz soit trop faible. La durée totale de la minéralisation sera comprise entre 1 h 48 min et 2 h 15 min.

Pour déterminer le temps d'ébullition spécifique nécessaire pour les conditions d'analyse du lait dans un laboratoire particulier utilisant un ensemble bien défini d'appareils. Sélectionner un échantillon de lait à haute teneur en protéines et en matières grasses et déterminer sa teneur en protéines en appliquant différents temps d'ébullition (de 1 h à 1 h 30 min) après l'éclaircissement.

Le résultat moyen de la teneur en protéines augmente avec le temps d'ébullition, se stabilise, puis diminue quand le temps d'ébullition est trop long. Choisir le temps d'ébullition qui permet d'obtenir la teneur maximale en protéines.

Au terme de Ia minéralisation, le minéralisat doit être transparent et exempt de matière non digérée. Laisser refroidir le minéralisat à température ambiante dans des flacons ouverts pendant environ 25 min. Si les ballons refroidissent sur les becs encore chauds, le temps pour atteindre la température ambiante sera plus long. A la fin de cette période de refroidissement de 25 min, il convient que le minéralisat refroidi soit complètement liquide ou liquide avec quelques petits cristaux au fond du ballon. Ne pas laisser le minéralisat non dilué dans les ballons pendant toute une nuit. En effet, le minéralisat non dilué peut se cristalliser lors de cette période et il sera ensuite très difficile de le remettre en solution.

Note - La cristallisation excessive au bout de 25 min est le résultat d'une perte d'acide trop importante au cours de la minéralisation et risque de donner des valeurs d'essai faibles. Cette perte d'acide est causée par une aspiration excessive des fumées ou par une minéralisation trop longue due à un réglage maximal incorrect du bec.

Ajouter 300 ml d'eau dans les ballons de Kjeldahl de 500 ml, ou 400 ml d'eau dans les ballons de Kjeldahl de 800 ml, en utilisant également l'eau pour éliminer tout résidu sur le col des ballons.

Mélanger complètement le contenu en s'assurant que tous les cristaux qui se sont formés sont dissous. Ajouter de 5 à 10 corps facilitant l'ébullition (4.4). Laisser le mélange refroidir à température ambiante avant de procéder à la distillation. Les minéralisats dilués peuvent être conservés dans des fioles bouchées et utilisés ultérieurement pour la distillation.

7.2.2 Distillation

Faire circuler l'eau du condenseur pour l'appareil distillation (4.8). Ajouter 75 ml de solution d'hydroxyde de sodium (3.4) au minéralisat dilué (7.2.1) en versant délicatement la solution dans le col incliné du ballon de Kjeldahl, de façon à former une couche au fond du bulbe du ballon, il convient que l'interface entre les deux solutions soit nette. Pour les deux solutions soit nette. Pour réduire le risque de perte d'ammoniac, relier le ballon de Kjeldahl à l'appareil de distillation (4.8) immédiatement après l'adjonction de la solution d'hydroxyde de sodium dans le ballon. La pointe du tube d'écoulement du condenseur est plongée dans 50 ml de la solution d'acide borique (3.6) contenue dans une fiole conique (4.9). Agiter vigoureusement par un mouvement de rotation le ballon de Kjeldahl jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de couches de solution séparées visibles dans le ballon. Placer le ballon sur le bec et mettre en marche le bec à un réglage suffisamment élevé pour porter le mélange à ébullition. Continuer la distillation jusqu'à ce qu'une ébullition irrégulière (ébullition pulsatoire) commence, puis déconnecter immédiatement le ballon de Kjeldahl et arrêter le chauffage. Arrêter l'eau du condenseur. Rincer à l'eau l'intérieur et l'extérieur de l'extrémité du tube d'écoulement, recueillir l'eau de rinçage dans la fiole conique et mélanger.

Le débit de distillation doit permettre de recueillir environ 150 ml de distillat avant que ne commence l'ébullition irrégulière (ébullition pulsatoire). Le volume total contenu dans la fiole conique sera d'environ 200 ml. Si le volume de distillat recueilli est inférieur à 150 ml, il est probable qu'une quantité d'eau inférieure à 300 ml ait été ajoutée pour diluer le minéralisat. L'efficacité du condenseur doit être telle que la température du contenu de la fiole conique ne dépasse pas 35°C pendant la distillation en cas d'utilisation d'un point final de titrage colorimétrique.

7.2.3 Titrage

Titrer le contenu de la fiole conique (7.2.2) avec l'acide chlorhydrique (3.7) à l'aide d'une burette (4.5). Le point final de titrage est atteint à la première trace de rose dans le contenu. Estimer la lecture de la burette à 0,05 ml près. Une plaque agitatrice magnétique éclairée peut faciliter la visualisation du point final de titrage.

Il est également possible de titrer le contenu de la fiole conique (7.2.2) avec l'acide chlorhydrique (3.7) au moyen d'un dispositif de titrage automatique étalonné équipé d'un pH-mètre (4.11). Le point final de titrage est atteint au pH 4,6, qui correspond au point le plus haut de la courbe de titrage (point d'inflection). Lire la quantité de solution titrée utilisée sur le dispositif de titrage automatique.

Note 1- La première trace de rose est observée entre pH 4,6 et pH 4,3 pour le système indicateur et la solution d'acide borique à 4 % spécifiée dans la présente méthode. En pratique, la variation du pH en fonction de l'ajout d'acide chlorhydrique à 0,1 mol/l est très rapide dans cette gamme de pH. Il faut environ 0,05 ml d'acide chlorhydrique à 0,1 mol/l pour changer le pH de 0,3 unité dans la gamme de pH comprise entre 4,6 et 4,3 dans ce système.

Note 2- Les statistiques intralaboratoires et interlaboratoires concernant cette méthode ont été déterminées à l'aide d'un titrage à point final colorimétrique. La comparaison entre les résultats d'essai, y compris ceux des essais à blanc, obtenus avec un point final de pH 4,6 et les résultats d'un titrage à point final colorimétrique a montré que, statistiquement, aucune différence significative n'était démontrable entre ces résultats.

7.3 Essai à blanc

Titrer les prises d'essai à blanc en utilisant toujours le même acide chlorhydrique (3.7) et la même burette (4.5) ou le même dispositif de titrage automatique équipé d'un pH-mètre (4.11) que pour les prises d'essai. Réaliser un essai à blanc en suivant le mode opératoire décrit-en (7.1) à (7.2.3), en remplaçant la prise d'essai par 5 ml d'eau avec environ 0,85 g de saccharose (3.10).

Consigner les valeurs à blanc. Si ces valeurs varient, identifier la cause de ce changement.

Note 1- Dans une prise d'essai à blanc ou un étalon de récupération, la saccharose est utilisée comme matière organique pour consommer, lors de la minéralisation, une quantité d'acide sulfurique pratiquement équivalente à celle nécessaire pour une prise d'essai. Si la quantité d'acide sulfurique libre restant à la fin de la minéralisation est insuffisante, la récupération de l'azote déterminée suivant les essais de récupération en (7.4.2) et (7.4.3) sera faible. Cependant, s'il reste, à la fin de la minéralisation, une quantité suffisante d'acide sulfurique libre pour retenir tout l'azote, mais que les conditions de température et de durée de la minéralisation ont été insuffisantes pour libérer totalement l'azote de l'échantillon, sa récupération en (7.4.2) sera acceptable tandis qu'elle sera faible en (7.4.3).

Il convient que la quantité de solution titrée utilisée pour la prise d'essai à blanc soit toujours supérieure à zéro. Il convient que les prises d'essai à blanc réalisées dans le même laboratoire soient stables dans le temps. Les valeurs-types de blanc sont inférieures ou égales à 0,2 ml.

Note 2 - Si la prise d'essai à blanc est déjà rose avant le début du titrage, cela n'est pas normal. En général, dans ce cas, les fioles coniques ne sont pas propres ou l'eau contenue dans l'air humide pouvant se condenser à l'extérieur de l'appareil condenseur est entrée dans la fiole de récupération, entraînant sa contamination.

7.4 Essais de récupération

7.4.1 Il convient de vérifier régulièrement la précision du mode opératoire par les essais de récupération suivants, réalisés conformément au mode opératoire décrit en (7.1) à (7.2.3).

7.4.2 Vérifier qu'il ne se produit aucune perte d'azote en utilisant une prise d'essai de 0,12 g de sulfate d'ammonium (3.8) avec 0,85 g de saccharose (3.1 0).

Note - La vérification de la récupération du sulfate d'ammonium ne donne aucune indication sur la capacité des conditions de minéralisation à libérer l'azote lié aux structures protéiques.

Le pourcentage d'azote récupéré doit être compris entre 99 % et 100 % pour toutes les positions de l'appareil. Pour les récupérations inférieures à 99 %, la normalité de la solution titrée est supérieure à la valeur fixée, où une perte d'azote peut avoir eu lieu lors de l'étape de minéralisation ou de distillation. Il est possible d'utiliser un mélange de sulfate d'ammonium et une petite quantité d'acide sulfurique (la quantité résiduelle à la fin de la minéralisation) dans un ballon de Kjeldahl.

Diluer avec un volume normal d'eau, ajouter la quantité normale d'hydroxyde de sodium, puis distiller. Si la récupération d'azote est toujours faible dans les mêmes proportions, la perte d'azote survient dans l'appareil de distillation et non pas dans celui de minéralisation. La cause en est probablement la fuite d'un tube dans un système traditionnel ou le fait que les pointes du condenseur ne sont pas immergées totalement dans l'acide borique dès le début de la distillation. Il convient que l'appareil soit soumis à cet essai avant que la récupération ne soit vérifiée suivant le mode opératoire donné en (7.4.3).

Si les récupérations d'azote sont supérieures à 100 %, aucune perte d'azote ne peut être constatée.

Dans ce cas, les causes peuvent être les suivantes :

a) le sulfate d'ammonium est contaminé;

b) la normalité réelle de la solution titrée est inférieure à sa valeur fixée ;

c) l'étalonnage de la burette pour la solution titrée est erroné ;

d) la température de la solution titrée est supérieure à la température d'étalonnage de la burette ;

e) l'écoulement de solution titrée à l'extérieur de la burette dépasse la vitesse maximale à laquelle l'étalonnage de la burette est valable.

7.4.3 Vérifier l'efficacité du mode opératoire de minéralisation en utilisant 0,16 g d'hydrochlorure de lysine (3.9) ou 0,18 g de tryptophane (3.9) avec 0,67 g de saccharose (3.10).

Un rapport de masse d'au moins 98 % de l'azote doit être récupéré. Si la récupération est inférieure à 98 % après avoir obtenu une récupération de 99 % à 100 % du sulfate d'ammonium, la température ou le temps de minéralisation est insuffisant (e) (suivre le mode opératoire donné en (7.2.1), premier alinéa et note 1), ou alors une partie de l'échantillon n'est pas digérée (à savoir brûlée) à l'intérieur du ballon de Kjeldahl. L'évaluation finale des performances est meilleure si elle est réalisée dans le cadre d'un programme d'essais de performances, dans lequel les paramètres statistiques intralaboratoires et interlaboratoires sont calculés sur la base d'une analyse d'échantillons de lait.

7.4.4 Des résultats inférieurs obtenus dans l'un ou l'autre des essais de récupération (ou supérieurs à 100 % en (7.4.2)) indiquent qu'il y a des erreurs dans le mode opératoire et/ou des imprécisions de concentration de la solution d'acide chlorhydrique (3.7).

8. CALCUL ET EXPRESSION DES RESULTATS

8.1 Calcul de la teneur en azote

8.1.1 Calculer la teneur en azote de l'échantillon pour essai, W_N , à l'aide de l'équation suivante :

$$W_N = \frac{1{,}4007\ (V_S - V_b)\ M_r}{m}$$

Où

W_N est la teneur en azote de l'échantillon pour essai, exprimée sous forme de pourcentage en masse ;

V_s est la valeur numérique du volume, en millilitres, de l'acide chlorhydrique (3.7) utilisé dans la détermination (7.2.3), exprimée, au moins, à 0,05 ml près ;

V_b est la valeur numérique du volume, en millilitres, de l'acide chlorhydrique (3.7) utilisé dans l'essai à blanc (7.3), exprimée, au moins, à 0,05 ml près ;

M_r est la valeur numérique de la molarité exacte de l'acide chlorhydrique (3.7), exprimée à quatre décimales près ;

m est la valeur numérique, en grammes de la masse de la prise d'essai (7.1), exprimée à 0,1 mg près.

8.1.2 Exprimer les résultats obtenus à quatre décimales près, si c'est nécessaire pour des calculs ultérieurs. S'il s'agit de résultats finaux (8.1), exprimer la teneur en azote à trois décimales près et la teneur en matière azotée totale à deux décimales. Il convient de ne pas arrondir les résultats avant l'utilisation finale de la valeur d'essai.

Note - Cela est particulièrement vrai lorsque les valeurs sont appelées à être utilisées pour des calculs ultérieurs. C'est le cas, par exemple, lorsque les valeurs d'essai individuelles obtenues à partir de l'analyse de plusieurs échantillons sont utilisées pour calculer les statitistiques de performance de la méthode concernant les variations intralaboratoires et interlaboratoires. C'est également le cas lorsque les valeurs servent de référence pour l'étalonnage d'un instrument (par exemple un analyseur de lait à infrarouge), où les valeurs concernant plusieurs échantillons seront utilisées pour un calcul de régression simple ou multiple. Dans ces cas, il convient de ne pas arrondir les résultats obtenus avant de les utiliser pour les calculs ultérieurs.

8.2 Calcul de la teneur en matière azotée totale

8.2.1 Calculer la teneur en matière azotée totale de l'échantillon pour essai, Wp, à l'aide de l'équation suivante :

$$Wp = W_N \times 6{,}38$$

Où

W_p est la teneur en matière azotée totale de l'échantillon pour essai, exprimée sous forme de pourcentage en masse ;

W_n est la teneur en azote de l'échantillon pour essai, exprimée sous forme de pourcentage en masse, à quatre décimales près (8.1) ;

6,38 est le coefficient multiplicateur généralement admis pour exprimer la teneur en azote en tant que teneur en matière azotée totale.

8.2.2 Exprimer les résultats obtenus pour la teneur en matière azotée totale à trois décimales près, si c'est nécessaire pour des calculs ultérieurs. S'il s'agit de résultats finaux (8.1), deux décimales suffisent.

9. FIDELITE

9.1 Essai interlaboratoires

Les valeurs de répétabilité et de reproductibilité sont issues des résultats d'un essai interlaboratoires. Les valeurs dérivées de cet essai peuvent ne pas être applicables aux plages de concentration et matrices autres que celles indiquées.

9.2 Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même appareillage dans un court intervalle de temps, n'excédera 0,006 % pour la teneur en azote (0,038 % pour la teneur en matière azotée totale) que dans 5 % des cas au plus.

9.3 Reproductibilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans des laboratoires différents par des opérateurs différents utilisant des appareillages différents, n'excédera 0,0077 % pour la teneur en azote (0,049 % pour la teneur en matière azotée totale) que dans 5 % des cas au plus.

REMARQUE

Mode opératoire pour l'analyse d'autres produits laitiers lorsqu'une méthode particulière n'existe pas pour ces produits

1. Généralités

Le mode opératoire décrit dans la présente méthode a été optimisé et ses performances ont été évaluées pour l'analyse du lait bovin. S'il n'existe aucune méthode particulière pour le produit concerné, un laboratoire peut souhaiter utiliser le même mode opératoire, avec des modifications mineures, pour la détermination de la teneur en azote d'une série de produits laitiers.

Il convient cependant de noter que le mode opératoire et ses performances n'ont pas été validés pour ce type d'application.

2. Mode opératoire

Peser à 0,1 mg près, la masse appropriée de prise d'essai extraite d'un échantillon pour essai correctement préparé, comme décrit ci-après. Déterminer la teneur en azote en suivant la méthode décrite en (7.1) à (7.4).

Il convient de ne pas modifier les quantités d'acide sulfurique (3.3) et de solution d'hydroxyde de sodium (3.4) utilisées dans les processus de minéralisation et de distillation. La modification du rapport entre la quantité d'acide et les autres composants en augmentant la quantité d'acide fait diminuer le point d'ébullition initial du mélange dans la minéralisation et n'est donc pas recommandée.

Il convient d'utiliser un effectif approprié de prise d'essai en travaillant avec les réactifs spécifiés dans la présente méthode. L'effectif approprié de prise d'essai peut être estimé comme suit pour tout échantillon pour essai.

La quantité optimale de protéines par ballon de Kjeldahl (4.2) doit être comprise entre 0,15 g et 0,30 g par ballon pour tout échantillon. Ainsi, si un échantillon moyen de Cheddar contient 24,00 % de protéines, il convient que la masse de la prise d'essai soit comprise entre 0,625 g et 1,25 g.

Le choix d'utiliser des masses de prise d'essai qui avoisinent la limite inférieure ou la limite supérieure de la plage dépend de la quantité d'acide qui sera consommée par les autres composants de l'échantillon lors de la minéralisation (c'est-à-dire les matières grasses et les hydrocarbures).

La présente méthode décrit l'ajout de 25 ml (environ 46 g) d'acide sulfurique à la prise d'essai dans le ballon de Kjeldahl. À la fin de la minéralisation, il doit rester environ 15 g d'acide sulfurique dans le ballon pour retenir tout l'azote.

Il convient de noter qu'une quantité d'acide sulfurique est consommée par la prise d'essai et également perdue par évaporation au cours de la minéralisation. La perte par évaporation peut être égale à la quantité consommée par les matières organiques dans une prise d'essai. La quantité finale d'acide résiduel sera fonction de ces deux processus. Si les pertes d'acide par évaporation sont très importantes (en raison d'une aspiration excessive des fumées au cours de la minéralisation ou du fait que le col des ballons est trop chaud), il se peut qu'il reste trop peu d'acide au terme de la minéralisation, même si la prise d'essai était de taille suffisante.

Une quantité résiduelle d'acide insuffisante conduira à la cristallisation du minéralisat au bout de 25 min de refroidissement et à une faible récupération d'azote.

La crème contenant 40 % de matières grasses est un exemple de produit délicat. Dans ce cas, la teneur en protéines ou en azote de l'échantillon est faible et la teneur en matières grasses est élevée. On prend pour hypothèse qu'un échantillon moyen de crème contient environ 40 % de matières grasses, 1,9 % de protéines et 2,9 % de lactose. Pour obtenir 0,15 g de protéines dans le ballon de Kjeldahl (4.2), il convient d'utiliser une prise d'essai de 7,89 g. Cette prise d'essai contient alors 3,16 g de matières grasses, qui consomment déjà elles-mêmes 56,9 g (environ 30,9 ml) d'acide sulfurique lors de la minéralisation, sans tenir compte de la perte d'acide sulfurique par évaporation (en supposant que 1 g de matière grasse consomme 18 g d'acide sulfurique au cours de la minéralisation). C'est un exemple de cas où la quantité de prise d'essai doit être réduite afin d'obtenir une quantité résiduelle suffisante d'acide sulfurique à la fin de la minéralisation. Dans le cas d'une matière telle que la crème, il convient d'utiliser une solution titrée de concentration inférieure (par exemple 0,01 mol/1). Dans de tels cas, il est nécessaire de réduire la quantité de prise d'essai pour qu'il reste une quantité suffisante d'acide sulfurique au terme de la minéralisation.

La quantité de saccharose requise pour un essai à blanc ou pour les étalons de récupération des produits autres que le lait bovin peut être déterminée comme suit :

Il faut tout d'abord réaliser une estimation des teneurs approximatives en matières grasses, en protéines et en hydrocarbures pour le type d'échantillon pour essai concerné et de l'effectif approximatif de la prise d'essai utilisée dans la minéralisation.

Ensuite, lors de la minéralisation, 1 g de matière grasse consommera environ 18 g d'acide sulfurique ; 1 g de protéines consommera environ 9 g d'acide sulfurique ; et 1 g d'hydrocarbures consommera environ 7 g d'acide sulfurique.

Sur la base de ces informations, il est possible de calculer la quantité d'acide consommée par une prise d'essai et la quantité de saccharose nécessaire pour consommer la même quantité d'acide lors de la minéralisation. Il convient que la quantité calculée de saccharose soit utilisée pour la prise d'essai à blanc et pour l'étalon de récupération du sulfate d'ammonium.

Pour l'étalon de récupération d'azote des acides aminés (7.4.3), réduire la quantité de saccharose de l'équivalent correspondant à l'acide qui sera consommé (calculé sous forme de protéines) par l'hydrochlorure de lysine ou le tryptophane. On prend pour hypothèse que la récupération d'azote lors de la minéralisation pour l'appareil utilisé est la même pour les échantillons autres que le lait, sans réaliser d'autres expériences de récupération pour obtenir des conditions permettant d'atteindre des niveaux similaires d'acide sulfurique résiduel à la fin de la minéralisation.

ARRETES, DECISIONS ET AVIS

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 4 Moharram 1437 correspondant au 18 octobre 2015 rendant obligatoire la méthode de préparation de l'échantillon pour essai en vue de l'analyse physique et chimique du lait.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 15-125 du 25 Rajab 1436 correspondant au 14 mai 2015, modifié, portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou El Kaâda 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu le décret exécutif n° 13-328 du 20 Dhou El Kaâda 1434 correspondant au 26 septembre 2013 fixant les conditions et les modalités d'agrément des laboratoires au titre de la protection du consommateur et de la répression des fraudes ;

Vu l'arrêté interministériel du 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation.

Arrête :

Article. 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de préparation de l'échantillon pour essai en vue de l'analyse physique et chimique du lait.

Art. 2. — Pour la préparation de l'échantillon pour essai en vue de l'analyse physique et chimique du lait, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 4 Moharram 1437 correspondant au 18 octobre 2015.

Bakhti BELAÏB.

— — — — — — — —

ANNEXE

METHODE DE PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI EN VUE DE L'ANALYSE PHYSIQUE ET CHIMIQUE DU LAIT

1. Objet et domaine d'application :

La présente méthode a pour objet de définir les directives générales pour la préparation des échantillons en vue des prises d'essais utilisées pour l'analyse physique et chimique du lait.

2. Principe :

Homogénéisation mécanique ou manuelle de l'échantillon pour essai, conditionnement à une température de 20° C ± 5° C et réalisation des prises d'essais.

3. Appareillage et verrerie :

3.1 Béchers de capacité 400 ml ;

3.2 Baguette en verre d'environ 20 cm de longueur et 8 mm de diamètre, légèrement recourbée à l'une des extrémités et revêtue d'un embout en caoutchouc ;

3.3 Homogénéisateur approprié de nettoyage facile, muni d'un système permettant le chauffage et le maintien du lait à une température d'environ 40° C.

A défaut de cet appareil (3.3), utiliser ce qui suit :

3.4 Ensemble pour l'homogénéisation manuelle ;

3.4.1 Bain marie réglé à 40° C ;

3.4.2 Tamis en métal inoxydable dont les ouvertures de mailles ne dépassent pas 0,5 mm ;

3.4.3 Entonnoir d'un diamètre légèrement supérieur à celui du tamis.

4. Mode opératoire :

4.1 Homogénéisation de l'échantillon :

Si l'analyse aura lieu immédiatement après le prélèvement ou au plus tard dans les deux (2) ou trois (3) heures qui suivent, une simple agitation de l'échantillon par retournements successifs du flacon suffit à rendre le contenu homogène.

Dans le cas contraire où l'analyse n'aura lieu que le lendemain du prélèvement ou quelques jours plus tard ou après un délai plus long, la matière grasse du lait se rassemble et prend en masse tout le long de la paroi du flacon ou sous le bouchon.

Il faut donc remettre la matière grasse en suspension homogène dans la totalité de l'échantillon, soit en utilisant un appareil mécanique à condition qu'il ne modifie en rien la composition du lait ni de point de vue qualitatif ni de point de vue quantitatif, soit manuellement et ce, à défaut de cet appareil (3.3).

4.1.1 Homogénéisation mécanique :

Le mode opératoire dépend de l'appareil dont on dispose. Dans tous les cas, il est indispensable de récupérer la totalité des dépôts qui adhérent aux parois du flacon de prélèvement ou au bouchon.

Il est avantageux de porter l'échantillon à une température de 40° C à 45° C de manière à faire fondre la matière grasse qui doit être liquide pour réaliser convenablement l'émulsion.

Note :

Utiliser l'appareil (3.3) selon les spécifications fixées par le fabricant et veiller en particulier à :

— ne rien introduire dans l'échantillon ;

— ne rien soustraire de l'échantillon durant tout le mécanisme, soit par rétention de la matière grasse ou de la caséine coagulée, soit par perte du sérum de lait avant l'incorporation des caillots ;

— éviter la formation de mousse ou d'émulsion d'air, dont la présence interdit toute mesure valable de la masse volumique ou toute prise d'essais en volume.

4.1.2 Homogénéisation manuelle :

4.1.2.1 Agiter l'échantillon par retournements successifs répétés et le ramener à une température d'environ 25° C.

Note :

Cette agitation ne doit pas être violente, puisque le flacon est plein ou presque plein. Il faut absolument éviter de provoquer la formation d'une émulsion d'air dans le lait, pour ne pas fausser les prélèvements. Cette première agitation n'a pas pour objet de rendre l'échantillon homogène, mais seulement de détacher la matière grasse des parois du flacon et de la rompre en un très grand nombre de menus fragments.

4.1.2.2 Verser au dessus du tamis (3.4.2) une partie de l'échantillon maintenu à 25° C environ et la recueillir dans un bécher (3.1) . Dilacérer les grumeaux à l'aide de la baguette (3.2) en utilisant le reste de l'échantillon. Transvaser à plusieurs reprises dans les béchers (3.1) afin que l'homogénéisation soit complète . Si la matière grasse n'est pas convenablement incorporée au lait, réchauffer l'échantillon au bain marie (3.4.1) et renouveler les opérations décrites en (4.1.2).

4.1.3 Cas particuliers :

4.1.3.1 Il peut arriver que l'échantillon est baratté au cours du transport, ou instantanément sous l'action de l'agitateur et que les grumeaux de matière grasse recueillis sur la passoire soient déjà constitués par de véritables amas de beurre.

Il convient, dans ce cas, de réchauffer l'échantillon à 40° C, sous l'action combinée du filet de lait chaud et de l'agitateur, ces amas fondent et se divisent en traversant la passoire.

Répéter l'opération une ou deux fois, puis refroidir l'échantillon . Dans ce cas, il est à préciser que, la matière grasse n'est pas finement réincorporée au lait. Le prélèvement correct en vue du dosage de la matière grasse sera difficile. à ce titre, l'homogénéisation mécanique est recommandée.

4.1.3.2 Dans le cas ou les grumeaux de crème adhéraient fortement au bouchon, débarrasser celui-ci de la matière grasse à l'aide de l'agitateur caoutchouté, le rincer sous le filet de lait et le laisser dans la passoire ou il subira d'abondants lavages au cours des transvasements successifs.

4.2 température de conditionnement :

Le matériel de prélèvement étant jaugé pour une température de 20° C et des déterminations physico-chimiques étant effectuées à cette température, il convient que le local, les réactifs et le lait lui-même soient à une température de 20° C ± 5° C.

Il convient également, d'amener le lait à cette température le plus rapidement possible.

4.3 Prises d'essais :

Après préparation de l'échantillon en vue de l'analyse physique et chimique, les prises d'essais devront être effectuées immédiatement . Il est recommandé d'effectuer sans interruption toutes les prises d'essais nécessaires aux divers dosages.

Dans tous les cas, procéder à une ultime agitation ménagée de l'échantillon avant chaque prélèvement.

Effectuer les prises d'essais soit par pesée, soit en volume. L'expression des résultats en volume de lait ou en masse de lait se fera en connaissant la masse volumique de l'échantillon de lait.

Toutes les prises d'essais en volume doivent être effectuées à 20° C avec de la verrerie convenable graduée à cette température.

———★———

Arrêté du 4 Moharram 1437 correspondant au 18 octobre 2015 rendant obligatoire la méthode de détermination de l'acidité titrable dans le lait sec.

———

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 15-125 du 25 Rajab 1436 correspondant au 14 mai 2015, modifié, portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou El Kaâda 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu le décret exécutif n° 13-328 du 20 Dhou El Kaâda 1434 correspondant au 26 septembre 2013 fixant les conditions et les modalités d'agrément des laboratoires au titre de la protection du consommateur et de la répression des fraudes ;

Vu l'arrêté interministériel du 13 Chaâbane 1419 correspondant au 2 décembre 1998 relatif aux spécifications techniques des laits en poudre et aux conditions et modalités de leur présentation ;

Vu l'arrêté du 17 Rajab 1420 correspondant au 27 octobre 1999, modifié et complété, relatif aux spécifications du lait en poudre industriel et aux conditions et modalités de sa présentation, sa détention, son utilisation et sa commercialisation ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de l'acidité titrable dans le lait sec.

Art. 2. — Pour la détermination de l'acidité titrable dans le lait sec, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet, doivent employer la méthode jointe en annexe.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 4 Moharram 1437 correspondant au 18 octobre 2015.

Bakhti BELAÏB.

———————

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE L'ACIDITE TITRABLE DANS LE LAIT SEC

1. Objet et domaine d'application :

La présente méthode a pour objet de définir une technique pratique de détermination de l'acidité titrable dans tous les types de lait sec.

2. Définition :

Acidité titrable du lait sec : nombre de millilitres d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 mol/l nécessaire pour neutraliser, en présence de phénolphtaléine, une quantité de lait reconstitué correspondant à 10g de solide non gras, jusqu'à apparition d'une coloration rose.

3. Principe :

Préparation du lait reconstitué par addition d'eau à une prise d'essai de lait sec correspondant exactement à 5 g de solide non gras. Titrage avec une solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 mol/l, en utilisant de la phénolphtaléine comme indicateur et du sulfate de cobalt (II) comme solution colorée de référence. Multiplication du nombre de millilitres utilisés pour le titrage par le facteur 2, de façon à obtenir le nombre de millilitres pour 10g de solide non gras.

La quantité de solution d'hydroxyde de sodium nécessaire est en fonction de la quantité de substances tampons présente à l'état naturel dans le produit et de l'acidité ou de l'alcalinité apparue ou ajoutée.

4. Réactifs :

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou déminéralisée, débarrassée du dioxyde de carbone par ébullition durant 10 min avant l'utilisation.

4.1 Hydroxyde de sodium, solution titrée, c(NaOH) = 0,1 ± 0,000 2 mol/l.

4.2 Solution colorée de référence,

Dissoudre 3g de sulfate de cobalt (II) heptahydraté ($CoSO_4 . 7H_2O$) dans de l'eau et compléter à 100 ml.

4.3 Solution de phénolphtaléine,

Dissoudre 2g de phénolphtaléine dans 75 ml d'éthanol à 95 % (*V/V*) et ajouter 20 ml d'eau. Ajouter de la solution d'hydroxyde de sodium (4.1) jusqu'à ce qu'une goutte provoque une faible coloration rose, et compléter à 100 ml avec de l'eau.

5. Appareillage :

5.1 Balance analytique,

5.2 Burette, graduée à 0,1 ml, avec une précision de 0,05 ml.

5.3 Pipettes, de 2 ml de capacité.

5.4 Eprouvettes graduées, de 50 ml de capacité.

5.5 Fioles coniques, à col rodé, de 100 ml ou de 150 ml de capacité. munies de bouchons en verre rodés.

6. Échantillonnage :

L'échantillonnage se fait dans des conditions appropriées.

7. Mode opératoire :

7.1 Préparation de l'échantillon pour essai :

Transvaser l'échantillon dans un récipient propre et sec (muni d'un couvercle étanche à l'air), d'une capacité d'environ le double du volume de l'échantillon.

Fermer immédiatement le récipient et mélanger soigneusement le contenu au moyen d'agitations et de retournements répétés du récipient. Eviter autant que possible d'exposer l'échantillon à l'air au cours de ces opérations, afin de réduire le plus possible l'adsorption d'eau.

7.2 Prise d'essai :

Prendre deux fioles coniques (5.5) et introduire, dans chacune d'elles, (500/*a*) ± 0,01g de l'échantillon pour essai (7.1).

a étant la teneur de l'échantillon en solide non gras, exprimée en pourcentage avec deux décimales.

Note - La teneur de l'échantillon en solide non gras peut être calculée en soustrayant de 100 la teneur en matière grasse et la teneur en eau.

7.3 Détermination :

7.3.1 Préparer le lait reconstitué en ajoutant 50 ml d'eau, à environ 20° C à la prise d'essai (7.2) et en agitant vigoureusement. Laisser reposer environ 20 min.

7.3.2 Ajouter à l'une des fioles coniques, 2 ml de la solution colorée de référence (4.2) pour avoir un témoin de couleur, et mélanger par agitation légère.

Note - Si l'on a une série de déterminations à effectuer sur des produits similaires, ce témoin de couleur pourra être utilisé pour toute la série. Cependant, il ne doit pas être utilisé plus de 2 h après sa préparation.

7.3.3 Ajouter à la seconde fiole conique, 2 ml de la solution de phénolphtaléine (4.3) et mélanger par agitation légère.

7.3.4 Titrer le contenu de la seconde fiole conique par addition, à l'aide de la burette (5.2), en agitant, de la solution d'hydroxyde de sodium (4.1), jusqu'à obtention d'une faible couleur rose semblable à celle du témoin de couleur et persistant durant environ 5 secondes. La durée du titrage ne doit pas dépasser 45 secondes.

Noter le volume de la solution d'hydroxyde de sodium utilisé en millilitres à 0,05 ml près.

8. Expression des résultats :

8.1 Mode de calcul et formule :

L'acidité titrable est égale à :

$$2 \times V$$

où V est le volume, en millilitres, de la solution d'hydroxyde de sodium (4.1), utilisé pour le titrage (7.3.4).

Exprimer le résultat avec une décimale.

8.2 Répétabilité :

La différence entre les résultats de deux déterminations, effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre par le même analyste, ne doit pas dépasser 0,4 ml de solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 mol/l pour 10g de solide non gras.

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DU COMMERCE

DIRECTION GÉNÉRALE DU CONTRÔLE ÉCONOMIQUE ET DE LA RÉPRESSION DES FRAUDES

Direction des Laboratoires d'Essais et d'Analyses de la Qualité

MÉTHODES OFFICIELLES D'ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES RELATIVES AUX VIANDES ET PRODUITS CARNÉS

Sommaire

1. Arrêté du 19 Octobre 2005 rendant obligatoire une méthode de Détermination de l'humidité de la viande et des produits de la viande. (JO n° 01 - 2006)	**01**
2. Arrêté du 15 Janvier 2006 rendant obligatoire une méthode de mesurage du pH de la viande et des produits de la viande. (JO n° 23 - 2006)	**04**
3. Arrêté du 25 Décembre 2005 rendant obligatoire une méthode d'échantillonnage et de préparation de l'échantillon pour l'essai de la viande et des produits de la viande. (JO n° 27 - 2006)	**07**
4. Arrêté du 21 Février 2006 rendant obligatoire une méthode de détermination de la teneur en phosphore totale de la viande et des produits de la viande. (JO n° 27 - 2006)	**09**
5. Arrêté du 26 Avril 2006 rendant obligatoire une méthode de détermination de la teneur en matière grasse totale de la viande et des produits de la viande. (JO n° 33 - 2006)	**12**
6. Arrêté du 26 Avril 200 6 rendant obligatoire une méthode de détermination de la teneur en azote totale de la viande et des produits de la viande. (JO n° 37 - 2006)	**15**
7. Arrêté du 29 Mars 2006 rendant obligatoire une méthode de détermination de la teneur en nitrate dans la viande et les produits de la viande. (JO n° 43 - 2006)	**19**
8. Arrêté du 29 Mars 2006 rendant obligatoire une méthode de détermination de la teneur en nitrites dans la viande et les produits de la viande. (JO n° 43 - 2006)	**23**
9. Arrêté du 08 Juillet 2006 rendant obligatoire une méthode de détermination de la teneure en azote basique volatil total dans les produits de la pêche. (JO n° 58 - 2006)	**26**
10. Arrêté du 08 Juillet 2006 rendant obligatoire une méthode de détermination de la teneur en histamine dans les produits de la pêche par chromatographie liquide haute performance. (JO n° 58 - 2006)	**28**
11. Arrêté du 08 Juillet 2006 rendant obligatoire une méthode de recherche et d'identification des substances anabolisantes dans la viande et les produits de la viande. (JO n° 59 - 2006)	**30**
12. Arrêté du 12 Novembre 2014 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en hydroxyproline dans les viandes et les produits à base de viande. (JO n° 69 - 2014)	**33**
13. Arrêté du 23 N ovembre 2014 rendant obligatoire la méthode de recherche des polyphosphates dans les viandes et les produits à base de viande. (JO n° 12 - 2015)	**37**
14. Arrêté du 25 Mars 2014 rendant obligatoire la méthode de détection des agents colorants dans les viandes et les produits à base de viande par chromatographie en couche mince. (JO n° 22 - 2015)	**40**

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 16 Ramadhan 1426 correspondant au 19 octobre 2005 rendant obligatoire la méthode de détermination de l'humidité de la viande et des produits de la viande.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 05-161 du 22 Rabie El Aouel 1426 correspondant au 1er mai 2005 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 19 Chaoual 1417 correspondant au 26 février 1997 relatif aux conditions de préparation et de commercialisation des merguez ;

Vu l'arrêté du 24 Rabie Ethani 1421 correspondant au 26 juillet 2000, modifié et complété, relatif aux règles applicables à la composition et à la mise à la consommation des produits carnés cuits ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de l'humidité de la viande et des produits de la viande.

Art. 2 — Pour la détermination de l'humidité de la viande et des produits de la viande, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3 — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 16 Ramadhan 1426 correspondant au 19 octobre 2005.

Lachemi DJAABOUBE.

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE L'HUMIDITE DE LA VIANDE ET DES PRODUITS DE LA VIANDE

1. DEFINITION

Humidité des viandes et produits à base de viande : perte de masse obtenue conformément aux conditions opératoires décrites ci-après. L'humidité s'exprime en pourcentage en masse.

2. PRINCIPE

Après formation d'un mélange homogène de la prise d'essai avec du sable et de l'éthanol, et présechage de ce mélange sur un bain d'eau, dessiccation à 103 ± 2 °C jusqu'à masse constante.

3. REACTIFS

3.1 **Sable.** Utiliser la fraction de sable qui passe à travers un tamis de 1,4 mm d'ouverture de maille, et qui reste sur un tamis de 250 µm.

Laver le sable à l'eau courante, puis le faire bouillir dans de l'acide chlorhydrique, ρ_{20} = 1,19 g/ml, dilué (1+1), pendant 30 min, en remuant continuellement. Répéter cette opération avec une nouvelle portion d'acide, jusqu'à ce que l'acide ne vire plus au jaune après ébullition.

Laver alors le sable avec de l'eau distillée jusqu'à ce que la recherche des chlorures donne un résultat négatif. Sécher le sable à une température comprise entre 150 et 160 °C et le conserver dans un flacon hermétiquement fermé.

3.2 **Ethanol ,** au moins 95% (V/V).

4. APPAREILLAGE

4.1 **Hachoir à viande,** type de laboratoire, muni d'une plaque dont les trous ont un diamètre n'excédant pas 4 mm.

4.2 **Capsule plate,** en porcelaine ou en métal (par exemple, en nickel, en aluminium ou en acier inoxydable), de 60 mm de diamètre minimal et d'environ 25 mm de hauteur.

4.3 **Fine baguette en verre,** aplatie à une extrémité et de longueur légèrement supérieure au diamètre de la capsule.

4.4 **Etuve,** à chauffage électrique, réglable à 103 ± 2 °C.

4.5 **Bain d'eau.**

4.6 **Dessiccateur,** garni d'un agent déshydratant efficace.

4.7 **Balance analytique.**

5. ECHANTILLON

5.1 Utiliser un échantillon représentatif initial d'au moins 200g, prélevé selon la méthode d'échantillonnage et de préparation de l'échantillon pour l'essai de la viande et des produits de la viande.

5.2 Conserver l'échantillon de façon à éviter sa détérioration et tout changement dans sa composition.

6. MODE OPERATOIRE

6.1 Préparation de l'échantillon

Rendre l'échantillon homogène par au moins deux broyages dans le hachoir (4.1) et en le mélangeant. Introduire l'échantillon dans un flacon étanche rempli complètement et le conserver de façon à éviter sa détérioration et tout changement dans sa composition. Analyser l'échantillon aussi rapidement que possible, mais toujours dans les 24 heures.

6.2 Prise d'essai

Sécher la capsule (4.2) contenant une quantité de sable (3.1) égale à trois ou quatre fois la masse de la prise d'essai et la baguette en verre (4.3) pendant 30 min dans l'étuve (4.4) réglée à 103 ± 2 °C.

Après refroidissement de l'ensemble dans le dessiccateur (4.6) jusqu'à la température ambiante, peser à 0,001 g près.

Transvaser de 5 à 10 g de l'échantillon dans la capsule et peser à nouveau à 0,001 g près.

6.3 Détermination

Ajouter 5 à 10 ml d'éthanol (3.2), selon la masse de la prise d'essai, et remuer la masse au moyen de la baguette en verre (4.3).

Placer la capsule et son contenu sur le bain d'eau (4.5), réglé à une température comprise entre 60 et 80 °C, de manière à éviter les projections, et maintenir le chauffage jusqu'à ce que l'éthanol se soit évaporé ; agiter de temps en temps.

Chauffer la capsule et son contenu pendant 2 h dans l'étuve (4.4) réglée à 103 ± 2 °C. Retirer la capsule et son contenu de l'étuve et la placer dans le dessiccateur (4.6).

Laisser refroidir la capsule et son contenu jusqu'à la température ambiante et peser à 0,001 g près.

Répéter les opérations de chauffage en étuve, de refroidissement et de pesée jusqu'à ce que les résultats de deux pesées consécutives, séparées par un chauffage de 1 h, ne diffèrent pas de plus de 0,1 % de la masse de la prise d'essai.

Effectuer deux déterminations sur le même échantillon préparé.

7. EXPRESSION DES RESULTATS

7.1 Mode de calcul et formule

L'humidité de l'échantillon "w" en pourcentage en masse, est égale à :

$$w = \frac{m_1 m_2}{m_1 - m_0} \times 100\%$$

Où :

$\mathbf{m_0}$ est la masse, en grammes, de la capsule, de la baguette et du sable;

$\mathbf{m_1}$ est la masse, en grammes, de la capsule, de la baguette, du sable et de la prise d'essai, avant séchage;

$\mathbf{m_2}$ est la masse, en grammes, de la capsule, de la baguette, du sable et de la prise d'essai, après séchage.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations, si les conditions de répétabilité (voir 7.2) sont remplies.

Noter le résultat avec une décimale.

7.2 Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations, effectuées simultanément, ou rapidement l'une après l'autre par le même analyste, ne doit pas être supérieure à 0,5g d'humidité pour 100 g d'échantillon.

— — — —

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 15 Dhou El Hidja 1426 correspondant au 15 janvier 2006 rendant obligatoire la méthode de mesurage du PH de la viande et des produits de la viande.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 05-161 du 22 Rabie El Aouel 1426 correspondant au 1er mai 2005 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 19 Chaoual 1417 correspondant au 26 février 1997 relatif aux conditions de préparation et de commercialisation des merguez ;

Vu l'arrêté du 24 Rabie Ethani 1421 correspondant au 26 juillet 2000, modifié et complété, relatif aux règles applicables à la composition et à la mise à la consommation des produits carnés cuits ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de mesurage du PH de la viande et des produits de la viande.

Art. 2 — Pour le mesurage du PH de la viande et des produits de la viande, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3 — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 15 Dhou El Hidja 1426 correspondant au 15 janvier 2006.

Lachemi DJAABOUBE.

— — — — — — — —

ANNEXE

METHODE DE MESURAGE DU PH DE LA VIANDE ET DES PRODUITS DE LA VIANDE

1. **DEFINITION**

PH des viandes et produits à base de viande :

Résultat des mesurages effectués selon la méthode décrite ci-dessous.

Note :

Du fait du taux excessivement élevé d'électrolytes dans la phase acqueuse de nombreux produits à base de viande, et du fait que, d'autre part, le PH-mètre est étalonné avec des solutions tampons à faible taux d'électrolytes, la valeur mesurée ne peut pas, en général, être considérée comme la valeur théorique du PH.

2. **PRINCIPE**

Mesurage de la différence de potentiel entre une électrode en verre et une électrode de référence plongées dans un échantillon de viande ou de produit à base de viande.

3. **LIQUIDES DE NETTOYAGE**

3.1 **Ethanol,** 95% (V/V).

3.2 **Oxyde diéthylique ,** saturé d'eau.

3.3 **Eau distillée** ou de pureté équivalente.

4. **APPAREILLAGE**

4.1 **PH-mètre,** gradué en 0,1 unité PH ou en unités plus petites, et permettant les lectures avec une précision de 0,05 unité PH. Si le PH-mètre n'est pas équipé d'un système de correction de la température, l'échelle doit s'appliquer à des mesurages à 20° C.

L'appareil doit être suffisamment protégé des effets induits provenant des charges électriques externes pendant les mesurages.

4.2 **Electrode en verre,** on peut utiliser des électrodes en verre de différentes formes géométriques : sphériques, coniques, cylindriques ou en forme d'aiguilles.

Conserver l'électrode en verre dans l'eau de telle façon que sa membrane soit immergée.

4.3 **Electrode de référence,** par exemple électrode au calomel ou électrode au chlorure d'argent contenant une solution saturée de chlorure de potassium.

A défaut d'instructions particulières, conserver l'électrode en verre dans une solution saturée de chlorure de potassium.

Note :

On peut réunir l'électrode en verre et l'électrode de référence en un système d'électrodes associées. A défaut d'instructions particulières, conserver celles-ci dans de l'eau distillée.

4.4 **Hachoir à viande,** type de laboratoire, muni d'une plaque perforée dont les trous ne dépassent pas 4 mm de diamètre.

5. **ECHANTILLON**

5.1 Opérer à partir d'un échantillon représentatif d'au moins 200g.

5.2 déterminer immédiatement le PH ou conserver l'échantillon de manière à réduire au minimum toute variation de son PH.

6. **MODE OPERATOIRE DES PRODUITS QUI ONT ETE HOMOGENEISES**

6.1 **Préparation de l'échantillon pour essai**

Excepté dans les cas d'essais non destructifs, homogénéiser l'échantillon de laboratoire en le faisant passer deux fois dans le hachoir à viande (4.4) et mélanger (voir 6.6).

6.2 **Prise d'essai**

Prélever une quantité de l'échantillon pour essai, suffisamment pour immerger ou enrober les électrodes.

6.3 **Etalonnage du PH-mètre**

Etalonner le PH-mètre en utilisant une solution tampon de PH exactement connu et aussi proche que possible du PH de la solution à déterminer (voir 8) à la température de mesurage.

Si le PH-mètre ne comprend pas de système de correction de température, la température de la solution tampon doit être amenée à 20 ± 2° C.

6.4 **Mesurage :**

6.4.1 Introduire les électrodes dans la prise d'essai et régler le système de correction de la température du PH-mètre à la température de la prise d'essai. S'il n'existe pas de système de correction de température, la température de la prise d'essai doit être amenée à 20 ± 2° C.

6.4.2 Mesurer en suivant la technique propre au PH-mètre utilisé. Lire le PH directement sur l'échelle de l'appareil, à 0,05 unité PH près, lorsqu'une valeur constante a été obtenue.

6.4.3 Effectuer trois déterminations sur le même échantillon pour essai.

6.5 **Nettoyage des électrodes :**

Nettoyer les électrodes en les essuyant successivement avec des morceaux d'ouate imbibés d'oxyde diéthylique (3.2), puis d'éthanol (3.1).

Enfin, les laver à l'eau (3.3) et les conserver selon les indications données en (4.2) et (4.3).

6.6 **Remarque sur le mode opératoire :**

Les échantillons de produits très secs peuvent, en plus, du traitement normal (voir 6.1), être homogénéisés avec une masse d'eau égale dans un appareil mélangeur pour laboratoire, avant de procéder au mesurage du PH.

6.7 **Expression des résultats :**

6.7.1 **Calcul :**

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des trois valeurs, si les conditions de répétabilité (voir 6.7.2) sont remplies.

Exprimer le PH moyen à 0,1 unité de PH près.

6.7.2 **Répétabilité :**

La différence entre les valeurs extrêmes résultant des trois mesurages ne doit pas dépasser 0,15 unité de PH.

7. **MODE OPERATOIRE POUR LES PRODUITS NON HOMOGENEISES :**

7.1 **Prise d'essai :**

Prélever une quantité de l'échantillon pour laboratoire suffisante pour permettre de mesurer le PH en plusieurs points.

7.2 **Etalonnage du PH-mètre :**

Voir (6.3).

7.3 **Mesurage :**

7.3.1 Lorsqu'il s'agit d'une prise d'essai de consistance ferme, ménager une cavité à l'endroit où est effectué le mesurage, de façon à pouvoir introduire l'électrode en verre sans la casser.

7.3.2 Reprendre les mêmes opérations telles que décrites aux points (6.4.1) et (6.4.2).

7.3.3 Recommencer le mesurage au même endroit.

7.3.4 S'il est jugé utile de connaître les différences de PH entre plusieurs points d'un produit, recommencer les mesurages en des points différents, dont le nombre doit être en fonction de la nature et de la taille de l'échantillon.

7.4 **Nettoyage des électrodes**

Voir (6.5)

7.5 **Expression des résultats**

7.5.1 **Calcul**

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux valeurs obtenues en un même point, si les conditions de répétabilité (7.5.2) sont remplies. Exprimer le PH moyen pour chaque point à 0,1 unité de PH près.

7.5.2 **Répétabilité :**

La différence entre les deux valeurs obtenues en un même point ne doit pas dépasser 0,15 unité de PH.

8. **NOTE SUR LE MODE OPERATOIRE**

Les solutions tampons suivantes peuvent être utilisées pour l'étalonnage.

Pour la préparation de ces solutions, tous les réactifs doivent être de qualité analytique. Utiliser de l'eau distillée ou de l'eau de pureté équivalente.

8.1 **Solution tampon PH 4,00 à 20° C,** préparée comme suit :

Peser, à 0,001 g près, 10,211 g d'hydrogénophtalate de potassium $KHC_6 H_4 (COO)_2$ séché préalablement à 125° C jusqu'à masse constante, et le dissoudre dans l'eau.

Compléter à 1.000 ml.

Cette solution a un PH de 4,00 à 10° C et de 4,01 à 30° C.

8.2 **Solution tampon PH 5,45 à 20° C,** préparée comme suit :

Mélanger 500 ml d'une solution aqueuse 0,2 N d'acide citrique avec 375 ml d'une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium 0,2 N.

Cette solution a un PH de 5,42 à 10° C et de 5,48 à 30° C.

8.3 **Solution tampon PH 6,88 à 20° C,** préparée comme suit :

Peser, à 0,001 g près, 3,402 g de dihydrogénophosphate de potassium ($KH_2 PO_4$) et 3,549 g d'hydrogénophosphate disodique ($Na_2 HPO_4$) et les dissoudre dans l'eau, compléter à 1.000 ml.

Cette solution a un PH de 6,92 à 10° C et de 6,85 à 30° C.

— — — — — — — —

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 23 Dhou El Kaada 1426 correspondant au 25 décembre 2005 rendant obligatoire la méthode d'échantillonnage et de préparation de l'échantillon pour l'essai de la viande et des produits de la viande.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 05-161 du 22 Rabie El Aouel 1426 correspondant au 1er mai 2005 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 19 Chaoual 1417 correspondant au 26 février 1997 relatif aux conditions de préparation et de commercialisation des merguez ;

Vu l'arrêté du 24 Rabie Ethani 1421 correspondant au 26 juillet 2000, modifié et complété, relatif aux règles applicables à la composition et à la mise à la consommation des produits carnés cuits ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode d'échantillonnage et de préparation de l'échantillon pour l'essai de la viande et des produits de la viande.

Art. 2. — Pour l'échantillonnage et la préparation de l'échantillon pour l'essai de la viande et des produits de la viande, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode décrite en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 23 Dhou El Kaada 1426 correspondant au 25 décembre 2005.

Lachemi DJAABOUBE.

ANNEXE

Méthode d'échantillonnage et de préparation des échantillons pour l'essai de la viande et des produits de la viande

1. Domaine d'application

1.1 La présente méthode donne des instructions générales et spécifie les techniques à suivre pour effectuer un prélèvement élémentaire à partir de viande et produits à base de viande.

1.2 Une distinction est faite entre les méthodes d'échantillonnage, selon les catégories de produits suivantes :

a) produits ou lots de viande et produits à base de viande préparés et emballés en unités de dimensions quelconques ou viande en morceaux ne pesant pas plus de 2 kg ;

b) carcasses, pièces de carcasses (par exemple, morceaux de viande frais ou congelés, viande désossée fraîche ou congelée, côtes de bœuf ou quartiers, carcasses de mouton) et viande découpée mécaniquement.

1.3 Le volume et la valeur commerciale de ces produits peuvent nécessiter l'emploi d'unités secondaires à échantillonner, en utilisant seulement une (des) partie(s) de chacune des unités à échantillonner, en tenant compte du but pour lequel ces unités sont démandées.

2. Méthodes d'échantillonnage

2.1 Matériel d'échantillonnage et récipients pour unité à échantillonner :

2.1.1 Conditions générales :

Les matériaux des récipients entrant directement en contac avec les unités à échantillonner doivent être étanches à l'eau et à la graisse, insolubles et non absorbants.

Les récipients doivent être de capacité et de forme adaptées à la taille des unités à échantillonner qui doivent être prélevées.

Si l'on utilise des flacons, ceux-ci doivent être bien fermés à l'aide d'un bouchon en caoutchouc ou en matière plastique convenable, ou d'un bouchon neuf de liège, ou par une capsule métallique ou en matière plastique qui se visse.

Les bouchons doivent être recouverts d'une feuille en matière inerte avant d'être adaptés au récipient qui contient l'échantillon. Les capsules qui se vissent doivent avoir un revêtement en matière inerte étanche aux liquides.

Les matériaux et le matériel ne doivent pas influencer les résultats des examens effectués et doivent en particulier répondre aux spécifications appropriées mentionnées aux points (2.1.2) à (2.1.3.) Il peut être nécessaire de diminuer l'action de la lumière et/ou de l'oxygène.

2.1.2 Matériel et récipients pour les unités à échantillonner en vue de l'analyse chimique.

Le matériel d'échantillonnage et les récipients pour l'unité à échantillonner doivent être secs et propres et ne doivent pas influencer la composition chimique du produit.

2.1.3 Matériel et récipients pour les unités à échantillonner en vue de l'analyse sensorielle.

Le matériel d'échantillonnage et les récipients pour l'unité à échantillonner doivent être secs et propres, et ne doivent pas transmettre de goût ou d'odeur au produit.

2.2 Nombre d'unités à échantillonner à prélever :

Le nombre d'unités à échantillonner de façon à obtenir un échantillon élémentaire, aussi représentatif que possible du lot, doit être en accord avec le plan d'échantillonnage spécifié dans le contrat ou bien accepté par les parties concernées.

Si différents types d'essais (à savoir chimiques, physiques et sensoriels) doivent être réalisés, des unités d'échantillonnage séparées doivent être prélevées pour chaque type d'essai.

2.3 Méthode d'échantillonnage :

2.3.1 Viande ou produits à base de viande préparés ou emballés en unités de dimensions quelconques ou viande en morceaux ne pesant pas plus de 2 kg :

Prélever des unités ou morceaux entiers constituant des unités élémentaires à échantillonner. Prélever le nombre requis d'unités élémentaires à échantillonner à partir de chaque lot selon le plan d'échantillonnage indiqué au point 2.2.

2.3.2 Carcasses, viande en morceaux pesant plus de 2 kg et viande découpée :

Prélever le nombre requis d'unités élémentaires à échantillonner à partir du lot, selon le plan d'échantillonnage indiqué au point (1.2) et mettre celles-ci de côté, soit pour prélever des unités secondaires à échantillonner en vue d'essais destructifs en laboratoire (par exemple examen chimique) soit pour des examens non destructifs (par exemple examen visuel, sensoriel, au moyen de tampon d'ouate).

Un seul échantillon prélevé à partir d'une carcasse ou d'une autre unité de viande de gros volume ne peut être réeellement représentatif de la totalité. De même, il est impossible d'analyser l'unité de viande entière. Par conséquent, la finalité pour laquelle les unités à échantillonner (élementaires ou secondaires) sont prélevées déterminera la technique à suivre. Ainsi, en général, des échantillons doivent être prélevés comme suit :

a) les unités secondaires à échantillonner découpées, de masse comprise entre 500g et 1kg, et destinées à un examen chimique de laboratoire, doivent être prélevées, quand cela est possible, à partir d'une surface déjà coupée et de manière à ne causer qu'un minimum de dommages ;

b) les unités de matière grasse à échantillonner (par exemple, pour évaluer les composés solubles dans les matières grasses, tels que certains pesticides) doivent être, dans toute la mesure du possible, prélevées à partir de la matière grasse du rein ;

c) les unités à échantillonner à partir de l'exsudat, par exemple, pour les viandes réfrigérées emballées sous vide, doivent être prélevées soigneusement à travers la pellicule ou après ouverture de l'emballage, en utilisant des seringues stériles et des fioles ou flacons. Si la viande est replacée dans le lot, la remettre dans un nouvel emballage sous vide.

2.3.3 Température :

Relever la température dans chacun des lots échantillonnés dans la mesure où cette opération est possible.

2.4 Emballage des unités à échantillonner :

2.4.1 Viande ou produits à base de viande préparés ou emballés en unités de dimensions quelconques, ou viande en morceaux pesant moins de 2 kg :

Si les unités sont emballées dans un récipient étanche à l'air, aucun emballage complémentaire n'est nécessaire. S'il n'en est pas ainsi, emballer chaque unité à échantillonner dans un récipient approprié qui est ensuite soigneusement fermé et scellé.

2.4.2 Carcasses, pièces de carcasses en morceaux pesant plus de 2 kg et viande découpée :

Emballer chaque unité à échantillonner dans un sac en matière plastique approprié, qui est ensuite soigeusement fermé et scellé.

2.5 Transport et stockage des unités à échantillonner :

Les unités à échantillonner doivent être expédiées au laboratoire le plus rapidement possible après l'échantillonage, tout en étant maintenues, durant ce temps, à la température de conservation du produit concerné. Toutefois, les unités à échantillonner de produits qui ont été entreposés au froid doivent être transportées :

— à une température de 0° C à 2° C si l'on estime qu'elles seront examinées dans les 24 h ;

— ou congelées à une température inférieure à – 24°C dans les autres cas.

Des précautions doivent être prises pour éviter une exposition directe à la lumière solaire pendant le transport. Les unités à échantillonner doivent arriver au laboratoire non endommagées, avec des scellés en bon état.

Arrêté du 22 Moharram 1427 correspondant au 21 février 2006 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en phosphore total de la viande et des produits de la viande.

———

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 05-161 du 22 Rabie El Aouel 1426 correspondant au 1er mai 2005 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 19 Chaoual 1417 correspondant au 26 février 1997 relatif aux conditions de préparation et de commercialisation des merguez ;

Vu l'arrêté interministériel du 29 Joumada Ethannia 1420 correspondant au 29 septembre 1999 fixant les règles de préparation et de mise à la consommation des viandes hachées à la demande ;

Vu l'arrêté du 24 Rabie Ethanni 1421 correspondant au 26 juillet 2000, modifié et complété, relatif aux règles applicables à la composition et à la consommation des produits carnés cuits ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de détermination de la teneur en phosphore total de la viande et des produits de la viande.

Art. 2. — Pour la détermination de la teneur en phosphore total de la viande et des produits de la viande, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode décrite en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 22 Moharram 1427 correspondant au 21 février 2006.

Lachemi DJAABOUBE.

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE LA TENEUR EN PHOSPHORE TOTAL DE LA VIANDE ET DES PRODUITS DE LA VIANDE.

1 . DEFINITION :

On entend par « teneur en phosphore total » des viandes et produits à base de viande la quantité de phosphore déterminée conformément à la méthode décrite ci–après.

La teneur en phosphore s'exprime en pourcentage en masse de pentoxyde de phosphore.

2. PRINCIPE :

Minéralisation de la prise d'essai par de l'acide sulfurique et de l'acide nitrique.

Précipitation du phosphore sous forme de phosphomolybdate de quinoléine. Séchage et pesée du précipité.

3. REACTIFS :

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau de pureté équivalente.

3.1 Acide sulfurique (P20 = 1,84 g/ml).

3.2 Acide nitrique (P20 = 1,40 g/ml).

3.3 Réactif précipitant.

3.3.1 Dissoudre 70g de molybdate de sodium dihydraté (Na2MoO4, 2H_2O) dans 150 ml d'eau.

3.3.2 Dissoudre 60g d'acide citrique monohydraté [CH2(CO_2H).COH(CO_2H).CH2(CO_2H).H_2O] dans 150 ml d'eau et ajouter 85 ml d'acide nitrique (3.2).

3.3.3 Ajouter progressivement, en agitant, la solution (3.3.1) à la solution (3.3.2).

3.3.4 A 100 ml d'eau, ajouter 35 ml d'acide nitrique concentré (3.2), puis 5 ml de quinoléine distillée.

— Ajouter progressivement cette solution au mélange (3.3.3) en agitant. Laisser reposer pendant 24 h à la température ambiante.

— Filtrer, ajouter 280 ml d'acétone et compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée.

Conserver le réactif à l'obscurité dans un flacon en matière plastique bien bouché.

4. APPAREILLAGE :

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

4.1 Hachoir à viande, du type laboratoire, muni d'une plaque perforée dont les trous ont un diamètre maximal de 4 mm.

4.2 Balance analytique de précision 0,001g.

4.3 Ballon de Kjeldahl, 250 ml ou fiole à col long et à fond rond.

4.4 Système de chauffage, permettant de chauffer le ballon de Kjeldahl (4.3) en position inclinée de telle manière que la source de chaleur n'atteigne que la partie du ballon située au-dessous du niveau du liquide.

4.5 Dispositif d'aspiration des vapeurs d'acide libérées pendant l'attaque chimique.

4.6 Filtre en verre fritté (Ø 10 à 16 µm).

4.7 Etuve à chauffage électrique, munie d'un réglage de température, capable de maintenir une température de 260°C ± 20°C.

4.8 Fiole à filtrer, 500 ml.

4.9 Dessiccateur, garni d'un déshydratant efficace.

4.10 Pipette Pasteur.

4.11 Réfrigérant à eau.

4.12 Bécher ou fiole conique de 250 ml

5. MODE OPERATOIRE :

5.1 Préparation de l'échantillon pour essai :

Opérer à partir d'un échantillon représentatif de 200 g au minimum. Le rendre homogène en le mélangeant après au moins deux passages dans le hachoir (4.1).

L'introduire dans un flacon étanche, que l'on remplit complètement, et assurer sa conservation de façon à éviter sa détérioration et tout changement dans sa composition.

Analyser l'échantillon aussi vite que possible, mais toujours dans les 24 h.

5.2 PRISE D'ESSAI :

Peser, à 0,001 g près, dans le ballon de Kjeldahl (4.3), environ 5 g de l'échantillon préparé.

5.3 Minéralisation :

Ajouter 20 ml d'acide nitrique (3.2) et quelques billes de verre ou régulateurs d'ébullition.

Placer le ballon de Kjeldahl en position inclinée (à un angle d'environ 40° par rapport à la verticale) sur le système de chauffage (4.4). Chauffer pendant 5 mn, laisser refroidir, puis ajouter 5 ml d'acide sulfurique (3.1).

Chauffer d'abord doucement jusqu'à cessation de la formation de mousse. Chauffer ensuite un peu plus fort. Dès que la carbonisation commence à se produire, ajouter encore un peu d'acide nitrique à l'aide d'une pipette Pasteur (4.11) et continuer le chauffage. Recommencer cette opération jusqu'à cessation de la production de fumées brunes.

Enfin, chauffer le liquide jusqu'à apparition de fumées blanches.

Refroidir, ajouter avec précaution 15 ml d'eau et faire bouillir doucement pendant 10 mn, en réduisant autant que possible l'évaporation de l'eau (par exemple, en plaçant sur l'orifice du ballon de Kjeldahl un morceau de verre piriforme).

Le volume total doit être alors de 50 ml.

Transvaser quantitativement le liquide dans un bécher ou une fiole conique de 250 ml (4.12). Rincer le ballon de Kjeldahl à plusieurs reprises avec de l'eau. Joindre les liquides de lavage au contenu de la fiole. Ajouter 10 ml d'acide nitrique.

5.4 Détermination :

Ajouter au liquide contenu dans la fiole conique ou le bécher 50 ml du réactif précipitant (3.3).

Recouvrir la fiole avec un verre de montre et laisser bouillir une minute sur une plaque chauffante, placée sous l'appareil d'aspiration (4.5).

Laisser refroidir à température ambiante en agitant trois à quatre fois au cours du refroidissement.

Filtrer quantitativement sous pression réduite sur un filtre en verre fritté (4.6), préalablement séché pendant 30 mn à une température de 250°C puis peser à 1 mg près, après refroidissement dans le dessiccateur (4.9).

Laver le précipité cinq fois sur le filtre avec des portions de 25 ml d'eau distillée.

Sécher dans l'étuve (4.7) à une température de 260°C ± 20°C pendant 1 heure.

Laisser refroidir dans le dessiccateur (4.9), puis effectuer la pesée, à 0,001 g près.

Note :

Dans le cas où la masse du précipité serait au moins égale à 25 mg, recommencer les opérations avec une prise d'essai moindre.

Effectuer deux déterminations sur le même échantillon préparé.

5.5 Essai à blanc :

Effectuer un essai à blanc en suivant le même mode opératoire et en employant les mêmes quantités de tous les réactifs, à l'exclusion de la prise d'essai.

6.EXPRESSION DES RESULTATS

6.1 Mode de calcul et formule

La teneur en phosphore total de l'échantillon, en pourcentage en masse de pentoxyde de phosphore est égale à :

$$0{,}03207 \times M \times \frac{100}{E} = 3{,}207 \frac{M}{E}$$

Où :

E : est la masse, en grammes, de la prise d'essai.

M : est la masse, en grammes, du précipité de phosphomolybdate de quinoléine (5.4).

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations, si les conditions de répétabilité sont remplies (6.2).

Exprimer le résultat avec deux décimales.

6.2 Répétabilité :

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées simultanément. ou rapidement l'une après l'autre par le même analyste, ne doit pas dépasser 0,02 g de pentoxyde de phosphore pour 100 g d'échantillon.

7. NOTE SUR LE MODE OPERATOIRE :

La minéralisation peut être effectuée par incinération en modifiant en conséquence les paragraphes (5.2) et (5.3) et en reprenant les cendres par 15 ml d'acide nitrique concentré (3.2). Utiliser un agitateur pour faciliter la dissolution. Transvaser quantitativement le liquide dans une fiole conique de 250 ml. Laver la capsule et l'agitateur à plusieurs reprises avec de l'eau. Joindre les liquides de lavage au contenu de la fiole. Compléter à 50 ml.

Adapter sur la fiole un réfrigérant ascendant (4.10) et maintenir à ébullition pendant 1/2 h. Laisser refroidir et procéder selon le paragraphe (5.4).

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 28 Rabie El Aouel 1427 correspondant au 26 avril 2006 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en matière grasse totale de la viande et des produits de la viande.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 05-161 du 22 Rabie El Aouel 1426 correspondant au 1er mai 2005 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 19 Chaoual 1417 correspondant au 26 février 1997 relatif aux conditions de préparation et de commercialisation des merguez ;

Vu l'arrêté interministériel du 29 Joumada Ethania 1420 correspondant au 29 septembre 1999 fixant les règles de préparation et de mise à la consommation des viandes hachées à la demande ;

Vu l'arrêté du 24 Rabie Ethani 1421 correspondant au 26 juillet 2000, modifié et complété, relatif aux règles applicables à la composition et à la consommation des produits carnés cuits ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de détermination de la teneur en matière grasse totale de la viande et des produits de la viande.

Art. 2. — Pour la détermination de la teneur de la matière grasse totale de la viande et des produits de la viande, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 28 Rabie El Aouel 1427 correspondant au 26 avril 2006.

Lachemi DJABOUBE.

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE LA TENEUR EN MATIERE GRASSE TOTALE DE LA VIANDE ET DES PRODUITS DE LA VIANDE

1. DEFINITION

La teneur en matière grasse totale des viandes et produits à base de viande s'exprime en pourcentage en masse.

2. PRINCIPE

Traitement de l'échantillon avec de l'acide chlorhydrique dilué bouillant pour libérer les fractions lipidiques incluses et liées.

Filtration de la masse résultante et, après séchage, extraction, au moyen de n-hexane ou d'éther de pétrole, de la matière grasse retenue sur le filtre.

3. REACTIFS

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau de pureté au moins équivalente.

3.1 Solvant d'extraction, n-hexane ou éther de pétrole, distillant entre 40°C et 60°C et ayant un indice de brome inférieur à 1. Le résidu d'évaporation complète, dans le cas des deux solvants, ne doit pas dépasser 0,002g pour 100 ml.

3.2 Acide chlorhydrique, solution 4 N environ.

Diluer 100ml d'acide chlorhydrique concentré (p_{20} = 1,19g/ml) avec 200 ml d'eau, et mélanger.

3.3 Papier de tournesol bleu.

3.4 Régularisateurs d'ébullition.

4. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

4.1 Hachoir à viande, de type laboratoire, muni d'une plaque dont les trous ont un diamètre n'excédant pas 4 mm.

4.2 Fiole conique, capacité 250 ml.

4.3 Verre de montre ou boîte de Pétri, de 80 mm de diamètre minimal.

4.4 Cartouche d'extraction, en papier filtre dégraissé.

4.5 Coton dégraissé.

4.6 Appareil d'extraction continue ou **semi-continue,** par exemple de type Soxhlet, avec une fiole d'extraction d'environ 150 ml.

4.7 Bain de sable ou **bain d'eau**, chauffé électriquement, ou appareil similaire approprié.

4.8 Etuve à chauffage électrique, réglable à 103 ± 2°C.

4.9 Dessiccateur, garni d'un agent déshydratant efficace.

4.10 Balance analytique de précision 0,001 g.

4.11 Papier filtre à plis, à filtration moyenne.

5. ECHANTILLON

5.1 Utiliser un échantillon représentatif initial d'au moins 200 g.

5.2 Conserver l'échantillon de façon à éviter sa détérioration et tout changement dans sa composition.

6. MODE OPERATOIRE

6.1 Préparation de l'échantillon

— Rendre l'échantillon homogène par au moins deux broyages dans le hachoir (4.1) et en le mélangeant. Introduire l'échantillon dans un flacon étanche rempli complètement et le conserver de façon à éviter sa détérioration et tout changement dans sa composition ;

— Analyser l'échantillon aussi rapidement que possible, mais toujours dans les 24 h. qui suivent l'homogénéisation.

6.2 Prise d'essai

Selon la teneur en matière grasse supposée, peser à 0,001 g près, de 3 à 5 g de l'échantillon broyé et les introduire dans la fiole conique de 250 ml (4.2).

6.3 Détermination

Sécher pendant 1 h à l'étuve (4.8) réglée à 103 ± 2°C, la fiole de l'appareil d'extraction (4.6) contenant des régularisateurs d'ébullition (3.4). Laisser refroidir la fiole jusqu'à la température ambiante dans le dessiccateur (4.9) et peser à 0,001 g près.

Ajouter, à la prise d'essai, 50 ml d'acide chlorhydrique (3.2) et couvrir la fiole conique (4.2) avec un petit verre de montre. Chauffer la fiole conique jusqu'à ce que le contenu commence à bouillir; maintenir l'ébullition pendant 1 h et agiter de temps en temps. Ajouter 150 ml d'eau chaude.

Mouiller le papier filtre (4.11) dans un entonnoir avec de l'eau et verser le contenu chaud de la fiole conique sur le filtre. Bien laver la fiole et le verre de montre trois fois avec de l'eau chaude et les sécher à l'étuve (4.8). Laver le papier filtre avec de l'eau chaude jusqu'à ce que les liquides de lavage ne modifient pas la couleur d'un papier de tournesol bleu (3.3). Mettre le papier filtre sur un verre de montre ou dans une boîte de Pétri (4.3) et sécher pendant 1 h à l'étuve réglée à 103 ± 2°C. Laisser refroidir.

Rouler le papier filtre et l'insérer dans la cartouche d'extraction (4.4). Enlever toute trace de matière grasse du verre de montre ou de la boite de Pétri en utilisant du coton (4.5) humidifié avec le solvant d'extraction (3.1) et mettre également le coton dans la cartouche d'extraction. Disposer la cartouche dans l'appareil d'extraction. Le papier filtre doit être manipulé soit avec des pincettes susceptibles d'être rincées, soit avec les doigts gantés de

papier. Verser le solvant d'extraction dans la fiole séchée de l'appareil d'extraction. Laver l'intérieur de la fiole conique utilisée pour l'attaque avec l'acide chlorhydrique, et le verre de montre la couvrant, avec une portion du solvant d'extraction et l'ajouter dans la fiole d'extraction. La quantité totale de solvant doit être d' une fois et demie à deux fois la capacité du tube d'extraction de l'appareil. Adapter la fiole à l'appareil d'extraction. Chauffer la fiole sur le bain de sable, le bain d'eau ou un appareil similaire (4.7) pendant 4 h.

Après extraction, prendre la fiole contenant le liquide provenant de l'appareil d'extraction et éliminer le solvant par distillation, en utilisant par exemple le bain de sable ou le bain d'eau.

Laisser évaporer les dernières traces du solvant au bain d'eau en utilisant, si nécessaire, un courant d'air.

Sécher la fiole pendant 1 h à l'étuve réglée à 103 ± 2°C et, après refroidissement à la température ambiante dans le dessiccateur, peser à 0,001 g près. Répéter cette opération jusqu'à ce que les résultats de deux pesées successives, séparées par un chauffage d'une heure, ne diffèrent pas de plus de 0,1% de la masse de la prise d'essai.

S'assurer que l'extraction est achevée en prenant une seconde fiole d'extraction et en procédant à une extraction pendant une nouvelle période de 1 h avec une portion fraîche de solvant. L'accroissement de masse ne doit pas excéder 0,l % de la masse de la prise d'essai.

Effectuer deux déterminations sur le même échantillon préparé.

7 . EXPRESSION DES RESULTATS

7.1 Mode de calcul et formule

La teneur en matière grasse totale de l'échantillon, en pourcentage en masse, est égale à :

$$= (m_2 - m_1) \times \frac{100}{m_0}$$

où :

m_0 est la masse, en grammes, de la prise d'essai ;

m_1 est la masse, en grammes, de la fiole et des régularisateurs d'ébullition ;

m_2 est la masse, en grammes, de la fiole des régularisateurs d'ébullition et de la matière grasse après séchage.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations, si les conditions de répétabilité, (7.2) sont remplies.

Noter le résultat avec une décimale.

7.2 Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées simultanément, ou rapidement l'une après l'autre, par le même analyste, ne doit pas être supérieure à 0,5 g de matière grasse totale pour 100 g d'échantillon.

ARRETES, DECISIONS ET AVIS

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 28 Rabie El Aouel 1427 correspondant au 26 avril 2006 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en azote total de la viande et des produits de la viande.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 05-161 du 22 Rabie El Aoual 1426 correspondant au 1er mai 2005 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 19 Chaoual 1417 correspondant au 26 février 1997 relatif aux conditions de préparation et de commercialisation des merguez ;

Vu l'arrêté interministériel du 29 Joumada Ethania 1420 correspondant au 29 septembre 1999 fixant les règles de préparation et de mise à la consommation des viandes hachées à la demande ;

Vu l'arrêté du 24 Rabie Ethani 1421 correspondant au 26 juillet 2000, modifié et complété, relatif aux règles applicables à la composition et à la consommation des produits carnés cuits ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de détermination de la teneur en azote total de la viande et des produits de la viande.

Art. 2. — Pour la détermination de la teneur en azote total de la viande et des produits de la viande, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 28 Rabie El Aouel 1427 correspondant au 26 avril 2006.

Lachemi DJAABOUBE.

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE LA TENEUR EN AZOTE TOTAL DE LA VIANDE ET DES PRODUITS DE LA VIANDE

1. DEFINITION

Teneur en azote des viandes et des produits à base de viande : Quantité d'azote correspondant à l'ammoniac produit et déterminée dans les conditions spécifiées ci-après.

2. PRINCIPE

Attaque d'une prise d'essai par l'acide sulfurique concentré qui transforme l'azote organique en ions ammonium, en présence de sulfate de cuivre (II) comme catalyseur; alcalinisation, distillation de l'ammoniac libéré dans un excès de solution d'acide borique, titrage de l'ammoniac combiné avec l'acide borique par l'acide chlorhydrique et calcul, à partir de l'ammoniac produit, de la teneur en azote de l'échantillon.

3. REACTIFS

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau de pureté au moins équivalente.

3.1 Sulfate de cuivre (II) pentahydrate ($CuSO4.5H_2O$)

3.2 Sulfate de potassium (K_2SO_4) anhydre.

3.3 Acide sulfurique, p_{20} 1,84 g/ml.

3.4 Hydroxyde de sodium, solution exempte de carbonate, contenant environ 33 g d'hydroxyde de sodium (NaOH) pour 100 g de solution.

— Dissoudre 500 g d'hydroxyde de sodium dans 1000 ml d'eau.

3.5 Acide borique, solution.

— Dissoudre 40 g d'acide borique (H_3BO_3) dans de l'eau et compléter à 1000 ml.

3.6 Acide chlorhydrique, solution titrée 0,1 N, la normalité étant connue avec quatre décimales.

3.7 Indicateur, solution : indicateur mixte (rouge de méthyle-bleu de méthylène), préparé par dissolution de 2g de rouge de méthyle et de 1g de bleu de méthylène dans 1000 ml d'éthanol à 95 % (V/V).

Le changement de couleur de la solution d'indicateur a lieu pour un pH de 5,4.

Conserver la solution d'indicateur dans une bouteille foncée dans un endroit sombre et frais.

3.8 Régularisateurs d'ébullition.

3.8.1 Pour l'attaque chimique

Billes en verre, carbure de silicium ou éclats de porcelaine dure.

3.8.2 Pour la distillation

Carbure de silicium ou morceaux de pierre ponce récemment incinérés.

4. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

4.1.1 Hachoir à viande, de type laboratoire, muni d'une plaque perforée dont les trous ont un diamètre ne dépassant pas 4 mm.

4.1.2 Homogénéisateur.

4.2 Papier sulfurisé, d'environ 9 cm x 6 cm.

4.3 Burette, de 50 ml de capacité.

4.4 Matras de Kjeldahl, de 800 ml de capacité maximale, muni, si nécessaire, d'un bouchon en verre piriforme s'adaptant librement au sommet du col.

4.5 Appareil d'entraînement par la vapeur, ou, en variante, appareil de distillation ordinaire.

4.6 Dispositif de chauffage, sur lequel le matras de Kjeldahl peut être chauffé en position inclinée de manière que la source de chaleur n'atteigne que la partie de la paroi du matras située au-dessous du niveau du liquide.

4.7 Dispositif d'aspiration, pour les vapeurs d'acide libérées pendant l'attaque chimique.

4.8 Balance analytique.

5. ECHANTILLON

5.1 Opérer sur un échantillon représentatif d'au moins 200g.

5.2 Conserver l'échantillon de façon à éviter toute détérioration et tout changement dans sa composition. Les agents de conservation, s'il y en a, ne doivent pas contenir de composants azotés en quantités mesurables.

6. MODE OPERATOIRE

6.1 Préparation de l'échantillon pour essai

Rendre l'échantillon homogène par au moins deux passages dans le hachoir à viande (4.1) et mélanger. Garder l'échantillon dans un flacon fermé, étanche et rempli complètement, et le conserver de façon à éviter toute détérioration et tout changement dans sa composition. Analyser l'échantillon dès que possible après l'homogénéisation, mais toujours dans les 24 h.

6.2 Prise d'essai

Placer quelques régularisateurs d'ébullition (3.8) dans le matras de Kjeldahl (4.4), puis ajouter environ 15g du sulfate de potassium anhydre (3.2) et 0,5 g du sulfate de cuivre(Il) (3.1).

Peser, à 0,001g près, environ 2 g (ou 1,5g dans le cas d'un échantillon très gras) de l'échantillon pour essai (6.1) sur un morceau de papier sulfurisé (4.2).

Introduire le papier sulfurisé et la prise d'essai dans le matras de Kjeldahl.

6.3 Détermination

Ajouter, dans le matras de Kjeldahl, 25 ml de l'acide sulfurique (3.3). Mélanger doucement la solution par rotation. Le cas échéant, un bouchon piriforme en verre peut être introduit dans le col du matras, l'extrémité effilée étant dirigée vers le bas.

Placer le matras en position inclinée (inclinaison d'environ 40° par rapport à la verticale) sur le dispositif de chauffage (4.6). Le chauffer d'abord doucement, jusqu'à ce que la formation de mousse cesse et que le contenu se soit complètement liquéfié. Puis attaquer en chauffant vigoureusement et en faisant tourner périodiquement le matras, jusqu'à ce que le liquide soit complètement limpide et de teinte claire bleu-vert.

Maintenir le liquide à ébullition durant encore 90 min.

La totalité de l'attaque chimique doit s'effectuer en un minimum de 2 h. Prendre soin qu'aucun liquide condensé ne coule sur la paroi extérieure du matras. Eviter que trop d'acide sulfurique ne s'échappe par suite d'une surchauffe pendant l'attaque chimique, ce qui risquerait d'entraîner une perte d'azote.

— Refroidir à environ 40 °C et ajouter, avec précaution, environ 50 ml d'eau. Mélanger et laisser refroidir.

— Verser, au moyen d'une éprouvette graduée, 50 ml de la solution d'acide borique (3.5) dans une fiole conique d'environ 500 ml de capacité, ajouter 4 gouttes de la solution d'indicateur (3.7), mélanger et placer la fiole sous le réfrigérant de l'appareil de distillation (4.5) de façon que l'extrémité de l'allonge plonge dans le liquide.

Opérer sur le contenu du matras de Kjeldahl selon l'une des deux techniques suivantes :

a) En cas d'entraînement par la vapeur

Transvaser le contenu du matras de Kjeldahl dans l'appareil de distillation et rincer le matras avec environ 50 ml d'eau. Ajouter, au moyen d'une éprouvette graduée, 100 ml de la solution d'hydroxyde de sodium (3.4), en les versant avec soin le long du col incliné du matras, afin que les deux couches ne se mélangent pas dans le matras. Relier immédiatement le matras à la tête à distiller de l'appareil de distillation. Chauffer le liquide alcalin en le faisant traverser par la vapeur jusqu'à ébullition et maintenir celle-ci durant 20 mn. Chauffer d'abord lentement afin de réduire à un minimum la formation de mousse. Le volume de distillat recueilli doit être d'au moins 150 ml.

b) En cas de distillation ordinaire

Diluer, avec précaution, le contenu du matras de Kjeldahl avec 300 ml d'eau et agiter par rotation. Transvaser, si nécessaire, dans une fiole de 1 litre. Après environ 15 mn, ajouter, au moyen d'une éprouvette graduée, 100 ml de la solution d'hydroxyde de sodium (3.4), en les versant avec soin le long du col incliné du matras, afin que les deux couches ne se mélangent pas dans le matras. Relier immédiatement le matras à la tête à distiller de l'appareil de distillation.

— Distiller au moins 150 ml du liquide, même si le mélange présente des soubresauts irréguliers. Poursuivre la distillation jusqu'à ce que le mélange commence à présenter des soubresauts ou jusqu'à l'obtention de 250 ml de distillat. S'assurer que le distillat est effectivement refroidi et éviter que la solution d'acide borique ne s'échauffe.

— Dans les deux cas, juste avant la fin de la distillation, abaisser la fiole conique afin que l'extrémité de l'allonge soit au-dessus du niveau du liquide. Rincer l'extrémité de l'allonge au-dessus du liquide (à l'intérieur et à l'extérieur) avec un peu d'eau. Vérifier que la distillation de l'ammoniac est achevée, au moyen d'un papier de tournesol rouge, humecté avec de l'eau distillée ; sa couleur ne doit pas être modifiée par le liquide provenant du réfrigérant. Arrêter le chauffage. Si la distillation se révèle être incomplète, effectuer une nouvelle détermination en se conformant soigneusement aux indications.

— Titrer le contenu de la fiole conique avec la solution d'acide chlorhydrique (3.6). Noter le volume de solution d'acide chlorhydrique nécessaire, en l'estimant à 0,02 ml près.

— Effectuer deux déterminations sur des prises d'essais provenant du même échantillon pour essai.

6.4 Essai à blanc

Effectuer toujours un essai à blanc (en double) lorsque de nouveaux lots de réactifs ou des solutions fraîchement préparées sont utilisés. Il est recommandé d'effectuer périodiquement un essai à blanc pour les réactifs et les solutions qui ont déjà été utilisés depuis quelques temps.

Effectuer cet essai à blanc selon (6.3) en prenant uniquement un morceau de papier sulfurisé (4.2).

7. EXPRESSION DES RESULTATS

7.1 Mode de calcul et formule

La teneur en azote, exprimée en pourcentage en masse, est égale à :

$$0{,}0014 \times (V_1 - V_0) \times \frac{100}{m}$$

Où

V_0 : est le volume, en millilitres, de solution d'acide chlorhydrique 0,l N, utilisé pour l'essai à blanc ;

V_1 : est le volume, en millilitres, de solution d'acide chlorhydrique 0,l N, utilisé pour la détermination ;

m : est la masse, en grammes, de la prise d'essai.

Note :

Si la solution titrée d'acide chlorhydrique utilisée n'a pas exactement la concentration prévue en (3.6), un facteur de correction approprié doit être utilisé pour le calcul du résultat.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations si les conditions de répétabilité (7.2) sont remplies.

Exprimer le résultat à 0,0lg près d'azote pour 100g d'échantillon.

7.2 Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées presque simultanément ou rapidement l'une après l'autre par le même analyste, ne doit pas dépasser 0,10g d'azote pour 100g d'échantillon.

8. REMARQUES

8.1 La détermination doit être effectuée dans une pièce exempte de vapeur d'ammoniac.

8.2 Il est également possible d'effectuer le dosage sur une partie aliquote du contenu du matras de Kjeldahl. Dans ces conditions, des modifications appropriées doivent être apportées à l'appareillage et au mode opératoire (quantités et concentrations des réactifs utilisés, temps de distillation, volume de distillat.

8.3 L'azote provenant de composés organiques non protéiques sera inclus dans la détermination, et ainsi des résultats inexacts de teneur en protéines seront obtenus si la teneur en protéines est calculée à partir de la teneur en azote.

Si, outre le résultat en azote, on veut exprimer le résultat en protéines, il faut indiquer le coefficient utilisé.

— — — —

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 29 Safar 1427 correspondant au 29 mars 2006 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en nitrates dans la viande et les produits de la viande.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 05-161 du 22 Rabie El Aoual 1426 correspondant au 1er mai 2005 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 19 Chaoual 1417 correspondant au 26 février 1997 relatif aux conditions de préparation et de commercialisation des merguez ;

Vu l'arrêté interministériel du 29 Joumada Ethania 1420 correspondant au 29 septembre 1999 fixant les règles de préparation et de mise à la consommation des viandes hachées à la demande ;

Vu l'arrêté du 24 Rabie Ethani 1421 correspondant au 26 juillet 2000, modifié et complété, relatif aux règles applicables à la composition et à la consommation des produits carnés cuits;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de détermination de la teneur en nitrates dans la viande et les produits de la viande.

Art. 2. — Pour la détermination de la teneur en nitrates dans la viande et les produits de la viande, les laboratoires du contrôle de la qualité, et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 29 Safar 1427 correspondant au 29 mars 2006.

Lachemi DJAABOUBE.

— — — — — — — —

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE LA TENEUR EN NITRATES DANS LA VIANDE ET LES PRODUITS DE LA VIANDE

1. DEFINITION

On entend par teneur en nitrates des viandes et produits à base de viande la teneur en nitrates déterminée suivant le mode opératoire décrit ci-après et exprimée en milligrammes de nitrate de potassium par kilogramme (parties par million).

2. PRINCIPE

Extraction à l'eau chaude de la viande ou du produit à base de viande, précipitation des protéines et filtration.

Réduction des nitrates extraits dans le filtrat en nitrites par du cadmium métallique. Obtention d'une coloration rouge par addition de chlorure de sulfanilamide et de chlorure de naphtyl-éthilène-diamine du filtrat et mesurage photométrique à une longueur d'onde de 538 mm.

3. REACTIFS

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de pureté au moins équivalente.

3.1 Solutions utilisées pour la précipitation des protéines.

3.1.1 Réactif I

Dissoudre 106g d'hexacyanoferrate de potassium trihydraté ($K_4Fe(Cn)_6,3H_20$) dans de l'eau et compléter à 1000 ml.

3.1.2 Réactif II

Dissoudre 220g d'acétate de zinc, dihydraté [$ZN(CH_3COO)_2,2H_20$] et 30 ml d'acide acétique cristalisable dans de l'eau et compléter à 1000 ml.

3.1.3 Solution saturée de borax

Dissoudre 50g de tétraborate de sodium décahydraté ($Na_2B_4O_7,10H_2O$) dans 1000 ml d'eau tiède et laisser refroidir à la température du laboratoire.

3.2 Zinc en baguettes, d'environ 15 cm de longueur et 5 à 7 mm de diamètre.

3.3 Sulfate de cadmium, solution à 30 g/l.

Dissoudre 37g de sulfate de cadmium (3CdSO4,8H2O) dans de l'eau et compléter à 1000 ml.

3.4 Acide chlorhydrique, solution environ 0,IN.

Diluer 8 ml d'acide chlorhydrique concentré (p_{20} = 1,19 g/ml) dans de l'eau et compléter à 1000 ml.

3.5 Solution tampon ammoniacale, pH 9,6 et 9,7.

Diluer 20 ml d'acide chlorhydrique concentré (p_{20} = 1,19 g/ml) avec 500 ml d'eau. Mélanger, ajouter 10g de sel disodique dihydraté de l'acide éthylène diamine tétraacétique [CH_2-N (CH_2-COOH) CH_2-COONa]$_2$, $2H_2O$ et 55 ml d'hydroxyde d'ammonium concentré (p20 = 0,88 g/ml). Compléter à 1000 ml avec de l'eau et mélanger. Contrôler le pH.

3.6 Nitrite de sodium, solutions étalons.

Dissoudre 1,000g de nitrite de sodium (NaNO2) dans de l'eau et compléter à 100 ml dans une fiole jaugée. Transférer, à la pipette, 5 ml de cette solution dans une fiole jaugée de 1000 ml. Ajuster au trait repère.

— Préparer une série de solutions étalons en transférant à la pipette 5, 10 et 20 ml de cette solution dans des fioles jaugées de 100 ml et en complétant au trait repère avec de l'eau. Ces solutions étalons contiennent respectivement 2,5, 5,0 et 10,0µg de nitrite de sodium par millilitre.

3.7. Solutions pour le développement de la coloration.

3.7.1 Solution I

Dissoudre par chauffage au bain d'eau 2g de sulfamilamide (NH_2-C_6H_4-SO_2-NH_2-) dans 800 ml d'eau. Refroidir et filtrer si nécessaire, et ajouter, en agitant, 100 ml d'acide chlorhydrique concentré (p_{20} = 1,19 g/ml). Compléter à 1000 ml avec de l'eau.

3.7.2 Solution II

Dissoudre, dans l'eau, 0,1g de chlorure de N naphtyl-1-éthylènediamine : ($C_{10}H_7$-NH-CH_2-CH_2-NH_2, 2HC). Compléter à 100 ml avec de l'eau.

3.7.3 Solution III

Compléter à 1000 ml, avec de l'eau 445 ml d'acide chlorhydrique (p20 = 1,19 g/ml).

Garder ces solutions dans des flacons brun foncé, bien fermés et les conserver au réfrigérateur, une semaine au maximum.

3.8 Nitrate de potassium, solutions étalons.

Dissoudre 1,465g de nitrate de potassium (KNO_3) dans de l'eau et compléter à 100 ml dans une fiole jaugée. Transférer, à la pipette, 5 ml de la solution dans une autre fiole jaugée de 1000 ml et ajuster au trait repère.

— Cette solution contient 73,25 µg/ml de nitrate de potassium.

— Cette solution étalon doit être préparée le jour même de son utilisation.

4. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

4.1 Hachoir à viande, de type laboratoire, muni d'une plaque dont les trous ont un diamètre ne dépassant pas 4 mm.

4.2 Balance analytique.

4.3 Fioles jaugées, 100 ml, 200 ml et 1000 ml.

4.4. Pipettes jaugées à un trait, de 20 ml, 10 ml et si nécessaire, d'une autre capacité, selon le prélèvement aliquote (5.8.1).

4.5 Bain d'eau bouillante.

4.6 Papier filtre à plis, de 15 cm de diamètre environ, exempt de nitrites et de nitrates.

4.7 Appareil en verre, destiné à la réduction des nitrates (voir figure).

4.8 Colorimètre photoélectrique ou spectrophotomètre avec cuves de 1 cm de parcours optique.

4.9 Fiole conique, de 300 ml.

5. MODE OPERATOIRE

5.1 Préparation de l'échantillon pour essai

Opérer à partir d'un échantillon représentatif d'au moins 200g.

— Rendre l'échantillon homogène par au moins deux passages dans le hachoir à viande (4.1) et mélanger. Le conserver au froid dans un flacon étanche rempli complètement.

— Analyser l'échantillon pour essai le plus rapidement possible, mais toujours dans les 24 h.

Note :

Dans le cas des produits non cuits, analyser l'échantillon immédiatement après homogénéisation.

5.2 Préparation de la colonne de cadmium

5.2.1 Placer 3 à 5 baguettes de zinc (3.2) dans la solution de sulfate de cadmium (3.3) contenue dans un bécher (1 litre de solution de sulfate de cadmium suffit pour préparer une colonne de cadmium).

Enlever, toutes les 1 ou 2 h, le cadmium métallique spongieux déposé sur les baguettes de zinc, en remuant celles-ci dans la solution ou en les frottant l'une contre l'autre.

5.2.2 Finalement, après 6 à 8 h, décanter la solution et laver le dépôt deux fois avec 1 litre d'eau distillée, en prenant soin que le cadmium soit continuellement recouvert d'une couche de liquide.

Transvaser le dépôt de cadmium au moyen de 400 ml de solution d'acide chlorhydrique (3.4) dans un appareil mélangeur pour laboratoire et mélanger pendant 10 secondes.

Remettre le contenu du mélangeur dans le bécher.

Agiter de temps en temps le dépôt de cadmium à l'aide d'une baguette de verre. Laisser reposer pendant une nuit dans la solution d'acide chlorhydrique.

5.2.3 Remuer encore une fois, afin d'éliminer toutes les bulles d'air du cadmium.

Décanter la solution et laver la bouillie de cadmium deux fois avec 1 litre d'eau à chaque fois.

Adapter un tampon en fibre de verre au fond de la colonne en verre destinée à contenir le cadmium.

Transvaser et laver la cadmium dans la colonne en verre en utilisant de l'eau jusqu'à ce que la hauteur de cadmium atteigne environ 17 cm. Vider la colonne de temps en temps pendant le remplissage, mais en prenant soin que le niveau du liquide ne tombe pas au dessous du sommet du lit de cadmium. Eliminer les inclusions de gaz (par exemple à l'aide d'une aiguille à tricoter), le liquide doit s'écouler avec une vitesse maximale de 3 ml/min.

5.3 PRISE D'ESSAI

Peser, à 0,001g près, 10g de l'échantillon pour essai.

5.4 Déprotéination

Transvaser quantitativement la prise d'essai dans la fiole conique (4.9) et ajouter, successivement, 5 ml de solution saturée de borax (3.1.3) et 100 ml d'eau à une température minimale de 70°C.

Chauffer la fiole pendant 15 min au bain d'eau bouillante (4.5) et agiter à plusieurs reprises.

Laisser refroidir à la température ambiante la fiole et son contenu et ajouter successivement 2 ml du réactif I (3.1.1) et 2 ml du réactif II (3.1.2). Mélanger soigneusement après chaque addition.

Transvaser dans une fiole jaugée de 200 ml (4.3). Laisser reposer pendant 30 minutes à la température ambiante. Compléter jusqu'au trait-repère avec de l'eau.

Mélanger soigneusement le contenu de la fiole jaugée et filtrer sur un papier filtre à plis (4.6).

5.5 Prétraitement de la colonne de cadmium

Laver la colonne de cadmium successivement avec 25ml de solution d'acide chlorhydrique (3.4), 50ml d'eau et 25 ml de la solution tampon ammoniacale (3.5) diluée à 1 + 9. Éviter que le niveau du liquide dans l'entonnoir ne tombe au-dessous du sommet du tube adducteur capillaire de la colonne.

5.6 Contrôle du pouvoir réducteur de la colonne de cadmium

5.6.1 Prélever 20ml de solution étalon de nitrate de potassium (3.8) avec une pipette, les verser dans le réservoir au sommet de la colonne, et ajouter, immédiatement après, 5ml de la solution tampon ammoniacale (3.5). Recueillir l'effluent dans une fiole jaugée de 100ml (4.3).

5.6.2 Lorsque le réservoir est presque vide, laver les parois avec environ 15ml d'eau et répéter la même opération avec une autre fraction de 15ml d'eau.

Lorsque cette fraction s'est écoulée dans la colonne, remplir le réservoir complètement avec de l'eau.

5.6.3 Après avoir recueilli presque 100ml de liquide, enlever la fiole de la colonne. Ajuster au trait-repère avec de l'eau.

5.6.4 Introduire, à la pipette, 10ml d'éluat dans une fiole jaugée de 100ml (4.3) et poursuivre selon les indications de (5.8.2 à 5.8.4).

5.6.5 Si la concentration de l'éluat en nitrites, déterminée à partir de la courbe d'étalonnage (5.9), est inférieure à 0,9 µg de nitrate de sodium par millilitre (c'est-à-dire 90% de la valeur théorique), la colonne de cadmium ne peut être utilisée.

5.7 Réduction des nitrates en nitrites

Introduire, à la pipette, dans le réservoir situé au sommet de la colonne, 20ml du filtrat (5.4) et, en même temps ou immédiatement après, 5ml de solution tampon ammoniacale (3.5).

Recueillir l'effluent de la colonne dans une fiole jaugée de 100 ml (4.3).

Procéder comme spécifié en (5.6.2) et (5.6.3).

5.8 Détermination

5.8.1 Introduire, à la pipette, dans une fiole jaugée de 100ml (4.3), une partie aliquote de l'éluat (5ml) ne dépassant pas 25ml et ajouter de l'eau de façon à obtenir un volume de 60ml environ.

5.8.2 Ajouter 10 ml de solution 1 (3.7.1) puis 6ml de solution III (3.7-3), mélanger et laisser la solution pendant 5 minutes à la température ambiante et à l'obscurité.

5.8.3 Ajouter 2ml de solution II (3.7.2.) mélanger et laisser la solution pendant 3 minutes à la température ambiante et à l'obscurité. Compléter au trait repère avec de l'eau.

5.8.4 Mesurer l'absorbance de la solution au colorimètre photoélectrique ou au spectrophotomètre (4.8) dans une cuve de 1cm de parcours optique à longueur d'onde d'environ 538 nm.

Note

Si l'absorbance de la solution colorée obtenue à partir de la prise d'essai est supérieure à celle de la solution étalon la plus concentrée, recommencer la détermination en diminuant la quantité d'éluat prélevée à la pipette en (5.8.1).

5.8.5 Effectuer deux déterminations sur le même échantillon pour essai.

5.9 Courbe d'étalonnage

— Transférer, à la pipette, respectivement dans quatre fioles jaugées de 100 ml (4.3), 10ml d'eau et 10ml de chacune des trois solutions étalons de nitrite de sodium (3.6), représentant 0µg - 2,5µg - 5,0µg et 10,0 µg de nitrites par millilitre.

— Dans chaque fiole, ajouter de l'eau pour obtenir un volume de 60ml environ, et procéder comme décrit en (5.8.2) à (5.8.4).

— Tracer la courbe d'étalonnage en portant les absorbances mesurées en fonction des concentrations, en microgrammes par millilitre de solution étalon de nitrite de sodium.

6. EXPRESSION DES RESULTATS

Calculer la teneur en nitrate de l'échantillon, exprimée en milligrammes de nitrate de potassium par kilogramme, au moyen de la formule :

$$KNO_3 = 1{,}465 \left(cx \frac{10000}{mxV} - NaNO_2\right)$$

où:

m : est la masse, en grammes, de la prise d'essai.

V : est le volume, en millilitres, de la partie aliquote d'éluat (5.8.1),

c : est la concentration de nitrite de sodium, en microgrammes, par millilitre, lue sur la courbe d'étalonnage, correspondant à l'absorbance de la solution préparée à partir de la prise d'essai (5.8.4),

$NaNO_2$: est la teneur en nitrite de l'échantillon, exprimée en milligrammes de nitrite de sodium par kilogramme.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations si les conditions de répétabilité (6.1) sont remplies. Noter le résultat à 1mg près.

6.1 Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations effectées simultanément ou rapidement l'une après l'autre, par le même analyste, ne doit pas être supérieure à 10 % de la teneur en nitrates.

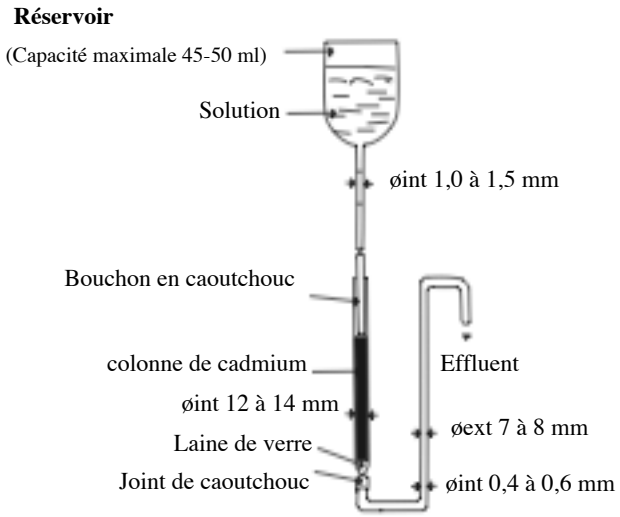


Figure - Appareil de réduction des nitrates

———★———

Arrêté du 29 Safar 1427 correspondant au 29 mars 2006 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en nitrites dans la viande et les produits de la viande.

———

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 05-161 du 22 Rabie El Aoual 1426 correspondant au 1er mai 2005 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 19 Chaoual 1417 correspondant au 26 février 1997 relatif aux conditions de préparation et de commercialisation des merguez ;

Vu l'arrêté interministériel du 29 Joumada Ethania 1420 correspondant au 29 septembre 1999 fixant les règles de préparation et de mise à la consommation des viandes hachées à la demande ;

Vu l'arrêté du 24 Rabie Ethani 1421 correspondant au 26 juillet 2000, modifié et complété, relatif aux règles applicables à la composition et à la consommation des produits carnés cuits ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de détermination de la teneur en nitrites dans la viande et les produits de la viande.

Art. 2. — Pour la détermination de la teneur en nitrites dans la viande et les produits de la viande, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 29 Safar 1427 correspondant au 29 mars 2006.

Lachemi DJAABOUBE.

———————

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE LA TENEUR EN NITRITES DANS LA VIANDE ET LES PRODUITS DE LA VIANDE

1. DEFINITION

Teneur en nitrites des viandes et produits à base de viande : la teneur en nitrites déterminée suivant le mode opératoire décrit ci-après et exprimée en miligrammes de nitrite de sodium par kilogramme (parties par million).

2. PRINCIPE

Extraction à l'eau chaude de la viande ou du produit à base de viande, précipitation des protéines et filtration.

En présence des nitrites, il y a obtention d'une coloration rouge par addition de sulfanilamide et de chlorure de naphtyl-l-éthylène-diamine du filtrat et mesurage photométrique à une longueur d'onde de 538 nm.

3. REACTIFS

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau de pureté au moins équivalente.

3.1 Solutions utilisées pour la précipitation des protéines.

3.1.1 Réactif I

Dissoudre 106g d'hexacyanferrate de potassium trihydraté ($K_4Fe(Cn)_6,3H_20$) dans de l'eau et compléter à 1000 ml.

3.1.2 Réactif II

Dissoudre 220 g d'acétate de zinc, dihydraté [$ZN(CH_3COO)_2,2H_20$] et 30 ml d'acide acétique cristalisable dans de l'eau et compléter à 1000 ml.

3.1.3 Borax, solution saturée

Dissoudre 50g de tétraborate disodique décahydraté [$Na_2B_4O_7,10H_20$] dans 1000 ml d'eau tiède et laisser refroidir à la température du laboratoire.

3.2 Nitrite de sodium : solutions étalons.

Dissoudre 1,000g de nitrite de sodium ($NaNO_2$) dans de l'eau et compléter à 100 ml dans une fiole jaugée.

— Transférer, à la pipette, 5 ml de cette solution dans une autre fiole jaugée de 1000 ml. Compléter au trait repère.

— Préparer une série de solutions étalons en transférant, à la pipette 5, 10 et 20 ml de cette solution dans des fioles jaugées de 100 ml et en complétant au trait repère avec de l'eau. Ces solutions étalons contiennent respectivement 2,5µg, 5,0µg et 10,0µg de nitrite de sodium par millilitre.

— Les solutions étalons, ainsi que la solution (0,05 g/l) de nitrite de sodium dont elles proviennent, doivent être préparées le jour de leur utilisation.

3.3 Solutions pour le développement de la coloration

3.3.1 Solution I

Dissoudre par chauffage au bain d'eau 2g de sulfanilamide (NH_2-C_6H_4-SO_2-NH_2) dans 800 ml d'eau. Refroidir et filtrer si nécessaire, et ajouter, en agitant, 100 ml d'acide chlorihydrique concentré (P_{20} = 1,19 g/ml). Compléter à 1000 ml avec de l'eau.

3.3.2 Solution II

Dissoudre, dans l'eau, 0,25g de chlorure de N naphtyl-l-éthylène-diamine :
($C_{10}H_7$-NH-CH_2-CH_2-NH_2,2HCI). Compléter à 250 ml avec de l'eau.

3.3.3 Solution III

Compléter à 1000 ml, avec de l'eau, 445 ml d'acide chlorhydrique (p20 = 1,19 g/ml)

Garder ces solutions dans des flacons brun foncé, bien fermés et les conserver au refrigérateur, une semaine au maximum.

4. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

4.1 Hachoir à viande, de type laboratoire, muni d'une plaque dont les trous ont un diamètre ne dépassant pas 4 mm.

4.2 Balance analytique.

4.3 Fioles jaugées, 100 ml, 200 ml et 1000 ml.

4.4. Pipettes à un trait, de 10 ml, et, si nécessaire, d'une autre capacité, selon le prélèvement aliquote (6.4.1).

4.5 Bain d'eau bouillante.

4.6 Colorimètre photoélectrique ou spectrophotomètre avec cuves de 1 cm de parcours optique.

4.7 Papier filtre à plis, de 15 cm de diamètre environ, exempt de nitrites.

4.8 Fiole conique, de 300 ml.

5. ECHANTILLON

5.1 Opérer à partir d'un échantillon représentatif d'au moins 200 g.

5.2 Préparer immédiatement l'échantillon pour essai (6.1). Si cela n'est pas possible, conserver l'échantillon, à une température comprise entre 0 et 5°C, durant 4 jours au maximum.

6. MODE OPERATOIRE

6.1. Préparation de l'échantillon pour essai

Rendre l'échantillon homogène par au moins deux passages dans le hachoir à viande (4.1) et mélanger. Le conserver au froid dans un flacon étanche rempli complètement.

Analyser l'échantillon pour essai le plus rapidement possible, mais toujours dans les 24 h.

Note :

Dans le cas de produits non cuits, analyser l'échantillon immédiatement après homogénéisation.

6.2 Prise d'essai

Peser, à 0,001g près, environ 10g de l'échantillon pour essai.

6.3 Déprotéination

6.3.1 Transvaser quantitativement la prise d'essai dans la fiole conique (4.8) et ajouter, successivement, 5 ml de solution saturée de borax (3.1.3) et 100 ml d'eau à une température minimale de 70°C.

6.3.2 Chauffer la fiole pendant 15 min au bain d'eau bouillante (4.5) et agiter à plusieurs reprises.

6.3.3 Laisser refroidir à la température ambiante la fiole et son contenu. Ajouter successivement 2 ml du réactif I (3.1.1) et 2 ml du réactif II (3.1.2). Mélanger soigneusement après chaque addition.

6.3.4 Transvaser dans une fiole jaugée de 200 ml (4.3).

Compléter jusqu'au trait repère avec de l'eau et mélanger.

Laisser reposer pendant 30 minutes à la température ambiante.

6.3.5 Laisser décanter soigneusement le liquide surnageant et filtrer sur le papier filtre à plis (4.7), de façon à obtenir une solution limpide.

6.4 Colorimétrie

6.4.1 Prélever à la pipette une partie aliquote du filtrat (5 ml) mais pas plus de 25 ml, l'introduire dans une fiole jaugée de 100 ml (4.3) et ajouter de l'eau pour obtenir un volume d'environ 60 ml.

6.4.2 Ajouter 10 ml de la solution I (3.3.1) puis 6 ml de la solution III (3.3.3.), mélanger et laisser la solution durant 5 min à la température ambiante et à l'obscurité.

6.4.3. Ajouter 2 ml de la solution II (3.3.2), mélanger et laisser la solution durant 3 à 10 min à la température ambiante, à l'obscurité. Compléter au trait repère avec de l'eau.

6.4.4 Mesurer l'absorbance de la solution colorée au colorimètre photoélectrique ou au spectrophotomètre (4.6), dans une cuve de 1 cm de parcours optique à une longueur d'onde d'environ 538 nm.

Note :

Si l'absorbance de la solution colorée obtenue à partir de la prise d'essai est supérieure à celle de la solution étalon la plus concentrée, recommencer les opérations décrites en (6.4) en diminuant la quantité de filtrat prélevée à la pipette (6.4.1).

6.5 Nombre des déterminations

Effectuer deux déterminations séparées en partant de prises d'essai prélevées sur le même échantillon pour essai.

6.6. Courbe d'étalonnage

6.6.1 Transférer à la pipette respectivement dans quatre fioles, jaugées de 100 ml (4,3), 10 ml d'eau et 10 ml de chacune des trois solutions étalons de nitrite de sodium (3.2), représentant 2, 5, 5,0 et 10,0 µg de nitrite par millilitre.

6.6.2 Dans chaque fiole, ajouter de l'eau pour obtenir un volume de 60 ml environ et procéder comme décrit de (6.4.2) à (6.4.4).

6.6.3 Tracer la courbe d'étalonnage en portant les absorbances mesurées en fonction des concentrations, en microgrammes par millilitre des solutions étalons.

7. EXPRESSION DES RESULTATS

7.1 Mode de calcul et formule

Calculer la teneur en nitrites de l'échantillon, exprimée en milligrammes de nitrites de sodium par kg à l'aide de la formule.

$$NaNO_2 = c \times \frac{2000}{m \times V}$$

où :

m : est la masse, en gramme, de la prise d'essai ;

V : est le volume, en millilitres, de la partie aliquote de filtrat (6.4.1) prélevée pour la détermination photométrique ;

c : est la concentration en nitrite de sodium, exprimé en microgrammes par millilitre, lue sur la courbe d'étalonnage et correspondant à l'absorbance de la solution préparée à partir de la prise d'essai (6.4.4).

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique de résultats des deux déterminations, si les conditions de répétabilité (7.2) sont remplies. Exprimer le résultat, à 1 mg près, par kilogramme de produit.

7.2. REPETABILITE

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre par le même analyste, ne doit pas être supérieure à 10 % de la valeur moyenne.

———★———

DECISIONS INDIVIDUELLES

ARRETES, DECISIONS ET AVIS

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 12 Joumada Ethania 1427 correspondant au 8 juillet 2006 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur de l'azote basique volatil total dans les produits de la pêche.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 06-176 du 27 Rabie Ethani 1427 correspondant au 25 mai 2006 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 04-189 du 19 Joumada El Oula 1425 correspondant au 7 juillet 2004 fixant les mesures d'hygiène et de salubrité applicables aux produits de la pêche et de l'aquaculture ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de la teneur de l'azote basique volatil total dans les produits de la pêche.

Art. 2. — Pour la détermination de la teneur de l'azote basique volatil total dans les produits de la pêche, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 12 Joumada Ethania 1427 correspondant au 8 juillet 2006.

Lachemi DJAABOUBE.

— — — — — — —

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE LA TENEUR EN AZOTE BASIQUE VOLATIL TOTAL DANS LES PRODUITS DE LA PECHE

1. **DEFINITION**

La dénomination Azote Basique Volatil Total (ABVT) s'applique à l'ensemble formé par l'ammoniac et les amines volatils.

La quantité d'ABVT est, pour une denrée, directement fonction du niveau de sa dégradation protéique.

2. **PRINCIPE DE DOSAGE :**

L'ABVT déplacé par le carbonate de lithium (base faible n'hydrolysant ni l'urée, ni les protides et acides aminés) est entraîné par la vapeur d'eau. Le distillat est titré par l'acide sulfurique.

3. **MATERIEL**

— ballon Pyrex de 500 ml ;

— réfrigérant ;

— système de raccordement à tube de réfrigérant droit ;

— bécher de 100 ml.

L'expérience montre qu'il y a intérêt à utiliser un montage avec rodages sphériques maintenus par pinces, qui se démontent facilement même à chaud et assurent une étanchéité suffisante.

4. **REACTIFS**

4.1 Eau fraîchement distillée.

4.2 Silicone Rhodorsil (antimousse). (*)

4.3 Ferrocyanure de potassium à 15 % dans l'eau.

4.4 Acétate de zinc à 30 % dans l'eau.

4.5 Solution de phénol-phtaléine à 2 % dans l'alcool à 90°.

4.6 Solution de carbonate de lithium à saturation (environ 8 %).

4.7 Solution aqueuse d'alizarine sulfonate de sodium à 0,5%.

4.8 Solution 0,1 N d'acide sulfurique.

5. **MODE OPERATOIRE**

Peser 10 g du produit à analyser. S'il s'agit d'un produit ayant séjourné dans l'huile (sardines en boîtes) ou dans un liquide (thon au naturel) avoir soin de l'essorer entre des feuilles de papier filtre.

— mettre dans un flacon cylindrique de 250 ml (à large ouverture) avec 50 ml d'eau distillée ;

— broyer avec un mixer rapide ;

— verser le broyat dans le ballon de l'appareil à distiller ;

— rincer le flacon et la tige du broyeur avec 50 ml d'eau.

Verser les eaux de rinçage dans le ballon. Puis ajouter successivement en agitant chaque fois

— 3 gouttes de Rhodorsil ;

— 1 ml de solution de ferrocyanure de potassium ;

— 1 ml de solution d'acétate de zinc ;

— 5 gouttes de solution de phénol-phtaléine ;

— 20 ml de solution de carbonate de lithium.

Cette dernière adjonction s'accompagne d'un virage au rouge franc de la phénol-phtaléine.

Relier aussitôt le ballon au réfrigérant descendant dont l'extrémité aboutira dans un bécher de 100 ml contenant 20 ml d'eau distillée et 5 gouttes d'alizarine. Le distillat doit tomber directement dans ce mélange, la partie inférieure du réfrigérant étant immergée.

Chauffer le ballon à ébullition et lorsque le virage au violet de l'alizarine est amorcé, poursuivre encore la distillation pendant 10 minutes.

Séparer le ballon du réfrigérant.

Rincer l'appareil de distillation et recueillir les eaux de lavage dans le bécher.

Doser l'A.B.V.T. à l'aide de la solution d'acide sulfurique 0,1 N par le virage au jaune paille de l'alizarine.

— — — — —

(*) Le produit à base de silicone évitant la formation gênante de mousse permet un chauffage rapide, le ferrocyanure de potassium et l'acétate de zinc réalisent une défécation qui assure le blocage des protides.

En outre l'adjonction de quelques fragments de pierre ponce sulfurique régularise l'ébullition.

6. **EXPRESSION DES RESULTATS**

L'ABVT. est exprimé en ammoniac (NH3 = 17). Le résultat est rapporté à 100 g de produit. Soit n le nombre de ml d'acide sulfurique 0,1 N utilisé pour la neutralisation.

On a :

ABVT (mg/100g) = 1,7 x n x 10 = 17n

———★———

Arrêté du 12 Joumada Ethania 1427 correspondant au 8 juillet 2006 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en histamine dans les produits de la pêche par chromatographie liquide haute performance.

———

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 06-176 du 27 Rabie Ethani 1427 correspondant au 25 mai 2006 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 04-189 du 19 Joumada El Oula 1425 correspondant au 7 juillet 2004 fixant les mesures d'hygiène et de salubrité applicables aux produits de la pêche et de l'aquaculture ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de la teneur en histamine dans les produits de la pêche par chromatographie liquide haute performance.

Art. 2. — Pour la détermination de la teneur en histamine dans les produits de la pêche par chromatographie liquide haute performance, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 12 Joumada Ethania 1427 correspondant au 8 juillet 2006.

Lachemi DJAABOUBE.

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE LA TENEUR EN HISTAMINE DANS LES PRODUITS DE LA PECHE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

1. **OBJET**

Cette méthode décrit le dosage de l'histamine dans le thon, la sardine, le maquereau, les anchois ou tout produit de la mer à l'état frais, congelé, fumé, séché, appertisé ou ayant subi tout autre traitement.

L'histamine est une amine provenant de la dégradation de l'histidine par décarboxylation. Sa présence, à des teneurs supérieures à 10 mg/100g dans des poissons, est susceptible de provoquer des phénomènes d'intoxication.

2. **PRINCIPE**

L'histamine est solubilisée dans de l'acide trichloroacétique, complexée avec l'ortho-phtalaldéhyde, séparée par chromatographie liquide haute performance (CLHP) sur phases inverses, puis détectée par fluorométrie.

3. **APPAREILLAGE**

— broyeur ;

— balance ;

— pompe isocratique pour chromatographie liquide ,

— injecteur type RHEODYNE avec boucle d'injection de 20 µl ;

— colonne C18 (20 cm x 4 mm) : silice sphérique 5 µm greffée C18 avec éventuellement une pré-colonne ;

— détecteur fluorométrique à flux continu avec une cellule de 20 µl ;

— enregistreur intégrateur ;

— utilisation éventuelle d'un auto-préparateur - injecteur automatique.

4. **REACTIFS**

— solution d'acide trichloroacétique 20% (TCA 20%) ;

— dichlorhydrate d'histamine (184,07 mM) ;

— solution d'histamine à 3,33 mg/ml.

Dissoudre 165,6 mg de dichlorhydrate d'histamine dans 100 ml de TCA 10 %.

Diluer au 1/3 puis au 1/100 :

— solution d'orthophtalaldéhyde (OPA) à 10 mg/ml dans du méthanol ;

— solution de soude 2 N ;

— solution d'acide chlorhydrique 3 N ;

— acétonitrile pour CLHP ;

— solution 1 mM de di-potassium hydrogéno-phosphate (K_2HPO_4).

Dissoudre 174,2 mg de K2HPO4 dans un litre d'eau ultra pure :

— solution éluante pour la chromatographie : 40 % d'acétonitrile et 60 % de solution 1 mM de K_2HPO_4 ;

— filtre 5 µm ;

— papier filtre plissé n° 127.

5. **MODE OPERATOIRE**

5.1 **Préparation du défécat trichloroacétique**

Broyer et homogénéiser un échantillon représentatif de 200 g environ et prélever immédiatement la prise d'essai.

5.1.1 **Cas des poissons frais et congelés**

Homogénéiser 100 g d'échantillon avec 50 ml d'eau dans un broyeur puis ajouter 50 ml de solution TCA à 20 %, mélanger de nouveau et filtrer sur filtre en papier plissé n° 127.

5.1.2 **Cas des poissons en conserve**

Même procédé avec 50 g de chair égouttée, 50 ml d'eau et 50 ml de solution TCA à 20 %.

5.1.3 **Cas des semi-conserves**

Même procédé avec 40 g de chair, 100 ml d'eau et 50 ml de solution TCA à 20 %.

5.2 **Réaction de complexation avec l'OPA**

Diluer au 1/10 dans de l'eau déminéralisée une fraction aliquote du filtrat et filtrer sur filtre de 5 µm.

La suite de la réaction peut se faire manuellement ou à l'aide d'un auto-préparateur-injecteur.

Prélever 100 µl de la solution au 1/10, ajouter 900 µl d'eau ultra-pure, alcaniser avec 200 µl de NaOH (2N) puis ajouter 100 µl de solution d'OPA (10 mg/ml), attendre quatre minutes puis bloquer la réaction en ajoutant 150 µl d'HCl (3N).

Bien agiter le tube après addition de chaque réactif et respecter rigoureusement les quatre minutes de temps de complexation.

5.3 **Passage en chromatographie**

— débit : 1 ml/min ;

— solvant d'élution : 40 % d'acétonitrile et 60 % de solution 1 mM de K_2HPO_4 ;

— volume injecté : 20 µl ;

— détection fluorométrique : longueur d'onde d'excitation 360 nm et longueur d'onde d'émission 450 nm ;

— enregistrement et intégration des aires des pics d'histamine ;

— le temps d'élution est d'environ 6 minutes.

Etalonnage externe (avec auto-préparateur)

— 100 µl d'une solution d'histamine à $3{,}33.\ 10^{-3}$ mg/ml ;

— 900 µl d'eau ;

— 200 µl NaOH 2N ;

— 100 µl OPA 10 mg /ml, attendre 4 minutes;

— 150 µl HCl 3N, passage en CLHP.

Les 20 µl injectés renferment 4,6 mg d'histamine.

Si la teneur en histamine est faible, faire la réaction de complexation sur le défécat TCA non dilué, ou faiblement dilué, par contre, si celle-ci est élevée, diluer le défécat de sorte à obtenir une lecture chromatographique proche de la solution étalon.

Effectuer deux déterminations sur le même défécat préparé.

6. EXPRESSION DES RESULTATS

6.1 Calcul

La teneur en histamine exprimée en mg pour 100 g d'échantillon est :

$$H = 6{,}66 \times \frac{A}{As}$$ poisson frais ou congelé

$$H = 10 \times \frac{A}{As}$$ poisson en conserve

$$H = 15{,}83 \times \frac{A}{As}$$ poisson semi-conserve

où :

As = aire du pic d'histamine de l'échantillon standard ; A = aire du pic d'histamine de l'échantillon à analyser.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations si les conditions de répétabilité sont remplies.

Exprimer le résultat à :

- 0,5 mg près (valeur absolue) pour des teneurs inférieures à 10 mg/100g ;

- 1 mg près (valeur absolue) pour des teneurs supérieures à 10 mg/100g ;

6.2 Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées par le même analyste ne doit pas excéder 5% en valeur relative.

6.3 Seuil de détection

- Poisson frais ou congelé : 0, 5 mg/100g ;

- Poisson en conserve: 0, 75 mg/100g ;

- Poisson semi-conserve:1 mg/100g.

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 12 Joumada Ethania 1427 correspondant au 8 juillet 2006 rendant obligatoire la méthode de recherche et d'identification des substances anabolisantes dans la viande et les produits de la viande.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 06-176 du 27 Rabie Ethani 1427 correspondant au 25 mai 2006 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 19 Chaoual 1417 correspondant au 26 février 1997 relatif aux conditions de préparation et de commercialisation des merguez ;

Vu l'arrêté interministériel du 29 Joumada Ethania 1420 correspondant au 29 septembre 1999 fixant les règles de préparation et de mise à la consommation des viandes hachées à la demande ;

Vu l'arrêté du 24 Rabie Ethani 1421 correspondant au 26 juillet 2000, modifié et complété, relatif aux règles applicables à la composition et à la consommation des produits carnés ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de recherche et d'identification des substances anabolisantes dans la viande et les produits de la viande.

Art. 2. — Pour la recherche et l'identification des substances anabolisantes dans la viande et les produits de la viande, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 12 Joumada Ethania 1427 correspondant au 8 juillet 2006.

Lachemi DJAABOUBE.

— — — — — — — —

ANNEXE

METHODE DE RECHERCHE ET D'IDENTIFICATION DES SUBSTANCES ANABOLISANTES DANS LA VIANDE ET LES PRODUITS DE LA VIANDE

1. **DOMAINE D'APPLICATION**

Cette méthode permet de rechercher et d'identifier des substances anabolisantes (liste I) dans la viande et les produits de la viande.

2. **PRINCIPE**

La chromatographie en couche mince est utilisée pour séparer les différents constituants qui sont ensuite révélés sous la forme de taches diversement colorées. La position relative et la coloration de ces taches en permettent l'identification. Cet examen est exclusivement qualitatif.

3. REACTIFS

3.1 Cristaux de standards de référence

3.1.1 Solution de travail dans du méthanol

(50 ng/µl) conservation à 4°C au réfrigérateur pendant 3 mois.

3.2 Solvants d'entraînement (produits purs pour analyse)

Chloroforme/méthanol (98 + V/V)

Préparation de la cuve 3 h avant le dépôt conservation maximum 48 h.

3.3 Révélateur après migration - mélange acide sulfurique/éthanol (50 + 50 : V/V).

Conservation température ambiante.

3.4 Plaques CCM 20 X 20 cm ou HPTLC 10 X 10 cm.

4. APPAREILLAGE

4.1 Hotte aspirante

4.2 Etuve à 100 °C

4.3 Source d'air chaud

4.4 Pulvérisateur

4.5 Transilluminateur

4.6 Cuve à chromatographie

4.7 Seringues 5 µl.

5. MODE OPERATOIRE

5.1 Extraction

Généralement par du méthanol (V/V) ou de l'éther éthylique (V/V). Pour les zones d'injection, après le broyage de la zone suspecte, une centrifugation ou une filtration est conseillée.

5.2 Dépôt sur plaque chromatographique (3.4)

5.2.1 Dépôt préliminaire d'un aliquote de la solution d'origine (1 µl) et de l'extrait (10 µl).

5.2.2 Selon résultats (5.2.1) . Dépôt des standards, suspectés et de l'échantillon à différentes concentrations (une évaporation préalable peut être envisagée).

5.3 Migration sur 7 cm dans une cuve saturée contenant 50 ml mélange chloroforme/méthanol (3.2).

Laisser sécher à l'air libre.

5.4 Vaporisation avec une solution d'acide sulfurique 50 % dans l'éthanol (3.3).

Noter les taches colorées.

Placer dans une étuve à 100°C pendant 10 minutes.

5.5 Lecture sous transilluminateur.

5.6 Identification

Par comparaison à la couleur des taches (des traces) apparues dans l'extrait et les standards de référence (liste II).

5.7 Confirmation

5.7.1 Co-Chromatographie

Ajouter au dépôt de l'échantillon 1 µl de la solution du standard correspondant.

Poursuivre (5.2), (5.3), (5.4) et (5.5).

Vérifier après révélation, passage sous transilluminateur qu'aucune nouvelle tache n'est apparue, que seule la tache présumée soit intensifiée.

Liste I

Substances anabolisantes recherchées

Chlormadinone acétate

Diethylstilboestrol (D.E.S)

D.E.S dispropionate

Dienestrol

Dienestrol diacetate

Nexoestrol

Nydroxyprogestérone heptanoate

Nédroxyprogestérone

Nédroxyprogestérone acétate

Nortestostérone

Nortestostérone propionate

Nortestostérone décanoate

Nortestostérone laurate

Oestradiol 17 oc

Oestradiol diacétate

Oestradiol dipropionate

Oestradiol benzoate

Oestradiol éthinyl

Progestérone

Testostérone

Testostérone propionate

Testostérone énanthate

Testostérone (méthyl)

Trenbolone acétate

Zéranol.

———————

Liste II

Standards de référence

Oestradiol -1

+ testostérone -2

Acétate de trenbolone -2

+ D.E.S -1

Méthyl testostérone -1

+ progestérone -2

Médroxy progestérone acétate -1

+ propionate de testostérone-2 Nandrolone décanoate Nandrolone -1 + D.E.S dipropionate -2 Oestradiol benzoate Cholestérol -2 + éthylène oestradiol -1 _ _ _ _ _ _ _ _	

ARRETES, DECISIONS ET AVIS

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 19 Moharram 1436 correspondant au 12 novembre 2014 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en hydroxyproline dans les viandes et les produits à base de viande.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 14-154 du 5 Rajab 1435 correspondant au 5 mai 2014 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu le décret exécutif n° 12-214 du 23 Joumada Ethania 1433 correspondant au 15 mai 2012 fixant les conditions et les modalités d'utilisation des additifs alimentaires dans les denrées alimentaires destinés à l'alimentation humaine ;

Vu l'arrêté interministériel du 19 Chaoual 1417 correspondant au 26 février 1997 relatif aux conditions de préparation et de commercialisation des merguez ;

Vu l'arrêté du 24 Rabie Ethani 1421 correspondant au 26 juillet 2000, modifié et complété, relatif aux règles applicables à la composition et à la mise à la consommation des produits carnés cuits ;

Arrête :

Article. 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de détermination de la teneur en hydroxyproline dans les viandes et les produits à base de viande.

Art. 2. — Pour la détermination de la teneur en hydroxyproline dans les viandes et les produits à base de viande, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet, doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 19 Moharram 1436 correspondant au 12 novembre 2014.

Amara BENYOUNES.

— — — — — — — —

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE LA TENEUR EN HYDROXYPROLINE
- Viandes et produits à base de viande -

La présente méthode décrit une technique pour la détermination de la teneur en hydroxyproline de toutes sortes de viandes et produits à base de viande, y compris la volaille.

La méthode est applicable aux viandes et produits à base de viande ne contenant pas plus de 0,5% (m/m) d'hydroxyproline.

1. DEFINITION

Pour les besoins de la présente méthode, la définition suivante s'applique.

Teneur en hydroxyproline des viandes et produits à base de viande : Teneur en hydroxyproline déterminée selon le mode opératoire décrit dans la présente méthode.

Elle est exprimée en pourcentage en masse.

2. PRINCIPE

Hydrolyse d'une prise d'essai par l'acide sulfurique à 105 °C. Filtration, puis dilution de l'hydrolysat. Oxydation de l'hydroxyproline par la chloramine T, puis formation d'un composé de couleur rouge avec le p-diméthylamino-benzaldéhyde. Mesurage photométrique à la longueur d'onde de 558 nm.

3. REACTIFS

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté, au moins, équivalente.

3.1 Acide sulfurique, solution $c(H_2S0_4) \approx 3$ mol/l.

Ajouter 750 ml d'eau dans une fiole jaugée de 2 L. Ajouter lentement, en agitant, 320 ml d'acide sulfurique concentré (P_{20} = 1,84 g/ml). Refroidir à température ambiante et compléter au trait repère avec de l'eau.

3.2 Solution tampon, pH = 6,8 composée de :

— 26 g d'acide citrique monohydraté ($C_6H_80_7,H_20$) ;

— 14 g d'hydroxyde de sodium ;

— 78 g d'acétate de sodium anhydre [$Na(CH_3C0_2)$].

Dissoudre les réactifs dans 500 ml d'eau, et les transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 1 L. Ajouter 250 ml de propanol-l et ajuster au trait avec de l'eau.

Cette solution reste stable durant plusieurs semaines, si elle est conservée à 4 °C à l'abri de la lumière.

3.3 Réactif à la chloramine T

Dissoudre 1,41 g de *N*-chloro-*p*-toluène sulfonamide, sel de sodium trihydraté (chloramine T) dans 100 ml de la solution tampon (3.2).

Cette solution doit être préparée immédiatement avant utilisation.

3.4 Réactif colorimétrique

Dissoudre 10 g de p- diméthylamino-benzaldéhyde dans 35 ml d'une solution d'acide perchlorique [60 % (m/m)], puis verser lentement 65 ml de propanol-2.

Cette solution doit être préparée le jour de son utilisation.

S'il est nécessaire de purifier le p-diméthylamino-benzaldéhyde (voir note 3 en 7.4), opérer comme suit :

Préparer, à chaud, une solution saturée de p-diméthylamino-benzaldéhyde dans de l'éthanol à 70 % (VIV). Refroidir d'abord à la température ambiante et enfin dans un réfrigérateur. Après environ 12 h, filtrer sur un entonnoir de Buchner.

Laver avec un peu d'éthanol à 70 % (V/V). Dissoudre de nouveau à chaud, dans de l'éthanol à 70 % (V/V). Ajouter de l'eau glacée et agiter soigneusement. Poursuivre ces opérations jusqu'à l'obtention d'une quantité suffisante de cristaux blanc laiteux. Laisser une nuit au réfrigérateur. Filtrer sur l'entonnoir de Buchner, laver avec de l'éthanol à 50 % (V/V), puis sécher sous pression réduite en présence d'oxyde de phosphore(V).

3.5 Hydroxyproline, solutions étalons.

Dans une fiole jaugée de 100 ml, préparer une solution mère en dissolvant 50 mg d'acide hydroxypyrrolidine-carbonique (hydroxyproline) dans de l'eau. Ajouter 1 goutte de la solution d'acide sulfurique (3.1) et compléter au trait repère avec de l'eau. Cette solution reste stable durant au moins 1 mois à 4 °C.

Le jour de l'emploi, introduire dans une fiole jaugée de 500 ml, 5 ml de la solution mère et compléter au trait repère avec de l'eau. Préparer ensuite quatre (4) solutions étalons en prélevant 10 ml, 20 ml, 30 ml et 40 ml de cette solution et en complétant à 100 ml avec de l'eau, afin d'obtenir respectivement des concentrations en hydroxyproline de 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 1,5 µg/ml et 2 µg/ml.

4. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit.

4.1 Hachoir électrique à viande, à lames horizontales à rotation rapide.

4.2 Ballon à hydrolyse, à fond rond ou à fond plat, à col large, d'environ 200 ml de capacité.

4.3 Étuve de séchage, réglable à 105°C ± 1°C.

4.4 Disques de papier filtre, de 12,5 cm de diamètre.

4.5 pH-mètre.

4.6 Feuilles d'aluminium ou **de plastique opaques**.

4.7 Bain d'eau, réglable à 60 °C ± 0,5 °C.

4.8 Spectromètre, permettant des mesurages à une longueur d'onde de 558 nm ± 2 nm, ou colorimètre photoélectrique, équipé d'un fitre interférentiel avec absorption maximale à 558 nm± 2 nm.

4.9 Cuves en verre, de 10 mm de parcours optique.

4.10 Balance analytique, précise à ± 0,001 g près.

4.11 Fioles jaugées, de 250 ml de capacité.

4.12 Verres de montre, de 5 à 6 cm de diamètre.

5. ECHANTILLONNAGE

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

Opérer sur un échantillon représentatif d'au moins 200 g.

Conserver l'échantillon de façon à éviter toute détérioration et tout changement dans sa composition.

6. PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI

6.1 Viandes crues et produits à base de viande crue

Au moyen d'un couteau bien aiguisé, découper la viande en petits cubes (d'environ 0,5 cm^3 de volume, c'est-à-dire d'environ 8 mm de côté) alors qu'elle est encore froide (très légèrement en dessous de 0 °C).

Placer l'échantillon dans un récipient que l'on bouchera hermétiquement, ou bien l'emballer sous pression réduite dans un sac en plastique thermorésistant. Chauffer ensuite le récipient et l'échantillon de manière à maintenir une température minimale de 70 °C pendant au moins 30 min. Laisser refroidir et opérer comme en (6.2).

Au cours des étapes suivantes de la préparation de l'échantillon pour essai et de la pesée de la prise d'essai, s'assurer que l'échantillon reste bien mélangé, et, en particulier, que la graisse et les portions fluides soient régulièrement réparties.

Note 1 - Ce traitement par la chaleur permet d'attendrir le tissu conjonctif cru et de le rendre moins résistant à l'opération d'homogénéisation au moyen du hachoir.

Cependant, ce traitement peut également provoquer la séparation d'un liquide contenant de la gélatine. La présence de graisse peut demander également une attention particulière lors de la préparation d'un échantillon homogène.

6.2 Viandes cuites et produits à base de viande cuite

Homogénéiser l'échantillon dans le hachoir à viande (4.1). Garder l'échantillon homogénéisé dans un flacon fermé, étanche et rempli complètement, et le conserver de façon à éviter toute détérioration et tout changement dans sa composition. Analyser l'échantillon dès que possible, mais toujours dans les 24 h.

7. MODE OPERATOIRE

7.1 Prise d'essai

Peser à 0,001 g près, dans le ballon à hydrolyse (4.2), environ 4 g de l'échantillon pour essai. S'assurer qu'il ne reste pas de produit adhérant à la paroi latérale du ballon.

7.2 Hydrolyse

7.2.1 Ajouter 30 ml ± 1 ml de solution d'acide sulfurique (3.1) dans le ballon. Le recouvrir avec un verre de montre (4.12) et placer l'ensemble dans l'étuve (4.3) pendant 16 h (une nuit) à 105 °C.

7.2.2 Filtrer l'hydrolysat encore chaud sur un disque de papier filtre (4.4), en recueillant le filtrat dans une fiole jaugée de 250 ml (4.11). Laver le papier filtre et le ballon trois (3) fois avec des fractions de 10 ml de la solution d'acide sulfurique (3.1) chaude, et ajouter les liquides de lavage à l27 1'hydrolysat. Compléter au trait repère avec de l'eau et mélanger.

7.3 Développement de la coloration et mesurage de l'absorbance

7.3.1 À l'aide d'une pipette, introduire, dans une fiole jaugée de 250 ml (4.11), un volume V de l'hydrolysat (7.2.2) permettant d'obtenir, après dilution à 250 ml, une concentration en hydroxyproline comprise entre 0,5 μg/ml et 2 μglml. Ajuster au trait repère avec de l'eau.

Note 2 - Dans la plupart des cas, V sera de l'ordre de 5 ml à 25 ml, selon la quantité de tissu conjonctif présente dans l'échantillon.

7.3.2 Introduire 4 ml de cette solution (7.3.1) dans un tube à essais, puis ajouter 2ml du réactif à la chloramine T (3.3). Mélanger et laisser à la température ambiante durant 20 min ±1 min.

7.3.3 Ajouter 2 ml du réactif colorimétrique (3.4), mélanger soigneusement et coiffer le tube avec une feuille d'aluminium ou de plastique (4.6).

7.3.4 Porter rapidement le tube dans le bain d'eau (4.7) réglé à 60 °C, et chauffer pendant 20 min exactement.

7.3.5 Refroidir le tube pendant au moins 3 min à l'eau courante, et le laisser à la température ambiante pendant 30 min.

7.3.6 Mesurer l'absorbance à 558 nm ± 2 nm par rapport à l'eau dans une cuve en verre (4.9), au moyen du spectromètre ou du colorimètre photoélectrique équipé d'un filtre interférentiel (4.8).

7.3.7 Soustraire l'absorbance mesurée à partir de l'essai à blanc (7.4) et lire la concentration en hydroxyproline de l'hydrolysat dilué sur la courbe d'étalonnage obtenue comme décrit en (7.5).

7.4 Essai à blanc

Effectuer, en double, les opérations décrites de (7.3.2) à (7.3.7), mais en remplaçant l'hydrolysat dilué par de l'eau.

Note 3 - Si l'absorbance de l'essai à blanc dépasse 0,04, préparer un nouveau réactif colorimétrique (3.4) et, si nécessaire, purifier le p- diméthylaminobenzaldéhyde (3.4).

7.5 Courbe d'étalonnage

7.5.1 Reprendre le mode opératoire décrit de (7.3.2) à (7.3.7) inclus, mais avec 4 ml de chacune des quatre solutions étalons diluées d'hydroxyproline (3.5) au lieu de 1'hydrolysat dilué.

7.5.2 Porter sur un graphique les valeurs des absorbances mesurées et corrigées pour l'essai à blanc, en fonction des concentrations correspondantes des solutions étalons d'hydroxyproline. Réunir les points et l'origine en traçant une courbe aussi droite que possible.

Etablir une nouvelle courbe d'étalonnage pour chaque série d'analyse.

8. Calcul

Pour chaque prise d'essai, calculer la teneur en hydroxyproline, en pourcentage en masse, à l'aide de la formule :

$$w_h = \frac{6{,}25\ c}{m \times V}$$

Où

w_h : est la teneur en hydroxyproline, exprimée en pourcentage en masse, obtenue à partir de la formule ;

c : est la concentration en hydroxyproline, en micro-grammes par millilitre, de l'hydrolysat dilué, lue sur la courbe d'étalonnage ;

m : est la masse, en grammes, de la prise d'essai (7.1) ;

v : est le volume, en millilitres, de la partie aliquote de l'hydrolysat prélevée pour la dilution à 250 ml (7.3.1).

Exprimer le résultat à 0,01 % près.

9. Fidélité

La fidélité de cette méthode a été établie par un essai interlaboratoires.

Le niveau de probabilité de 95 % a été retenu pour obtenir les valeurs de répétabilité et de reproductibilité.

9.1 Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans le même laboratoire et par le même opérateur utilisant le même appareillage et dans un court intervalle de temps, ne doit pas être supérieure à la valeur de r donnée par la formule :

$$r = 0{,}0131 + 0{,}0322\ \overline{w_h}$$

Où

$\overline{w_h}$: est la moyenne des deux résultats d'essai, pour la teneur en hydroxyproline, exprimée en pourcentage en masse.

Rejeter les deux résultats si la différence dépasse la valeur indiquée ci-dessus, et réaliser deux nouvelles déterminations.

9.2 Reproductibilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans des laboratoires différents par des opérateurs différents utilisant des appareillages différents, ne doit pas être supérieure à la valeur de R donnée par la formule :

$$R = 0{,}0195 + 0{,}0529\ \overline{w_h}$$

Où

$\overline{w_h}$ est la moyenne des deux résultats d'essai, pour la teneur en hydroxyproline, exprimée en pourcentage en masse.

Arrêté du 30 Moharram 1436 correspondant au 23 novembre 2014 rendant obligatoire la méthode de recherche des polyphosphates dans les viandes et les produits à base de viande.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 14-154 du 5 Rajab 1435 correspondant au 5 mai 2014 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu le décret exécutif n° 12-214 du 23 Joumada Ethania 1433 correspondant au 15 mai 2012 fixant les conditions et les modalités d'utilisation des additifs alimentaires dans les denrées alimentaires destinées à l'alimentation humaine ;

Vu l'arrêté interministériel du 19 Chaoual 1417 correspondant au 26 février 1997 relatif aux conditions de préparation et de commercialisation des merguez ;

Vu l'arrêté du 24 Rabie Ethani 1421 correspondant au 26 juillet 2000 relatif aux règles applicables à la composition et à la mise à la consommation des produits carnés cuits ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de recherche des polyphosphates dans les viandes et les produits à base de viande.

Art. 2. — Pour la recherche des polyphosphates dans les viandes et les produits à base de viande, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 30 Moharram 1436 correspondant au 23 novembre 2014.

Amara BENYOUNES.

— — — — — — — —

ANNEXE

Méthode de recherche des polyphosphates

Viandes et produits à base de viande

La présente méthode spécifie un mode opératoire pour la recherche des polyphosphates linéaires condensés dans les viandes et les produits à base de viande, après séparation par chromatographie en couche mince.

Etant donné que les phosphates sont progressivement hydrolysés par les enzymes présents dans les viandes ou les produits à base de viande et au cours du traitement par la chaleur des viandes ou des produits à base de viande, la présente méthode s'applique uniquement à la recherche des polyphosphates ajoutés qui sont encore présents dans l'échantillon au moment de la recherche.

1. PRINCIPE

Extraction des viandes ou des produits à base de viande par l'acide trichloracétique. Défécation du sérum obtenu au moyen d'un mélange éthanol/oxyde diéthylique. Séparation des phosphates par chromatographie en couche mince. Recherche des polyphosphates par pulvérisation avec des réactifs pour le développement de la couleur.

2. REACTIFS

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue. L'eau doit être distillée ou une eau de pureté, au moins, équivalente.

Pour les besoins de cette méthode les réactifs suivants sont utilisés :

2.1 Acide trichloracétique.

2.2 Oxyde diéthylique.

2.3 Ethanol, à 95 % (*V/V*).

2.4 Cellulose en poudre, de qualité pour chromatographie en couche mince.

2.5 Amidon soluble.

2.6 Mélange de référence

Dissoudre, dans 100 ml d'eau :

— 200 mg de dihydrogénophosphate de sodium monohydraté ($NaH_2PO_4.H_2O$),

— 300 mg de diphosphate tétrasodique décahydraté ($Na_4P_2O_7.10H_{20}$),

— 200 mg de triphosphate pentasodique ($Na_5P_3O_{10}$), et

— 200 mg d'hexamétaphosphate de sodium ($NaPO_3$) x [$x > 10$].

Le mélange de référence reste stable à 4 °C durant, au moins, 4 semaines.

2.7 Solvant de développement

Mélanger 140 ml d'alcool isopropylique, 40 ml d'une solution d'acide trichloracétique à 135 g/l et 0,6 ml de solution d'hydroxyde d'ammonium, P_{20} = 0,90 g/ml, à environ 25 % (*m/m*).

Conserver le solvant dans un flacon hermétiquement clos.

2.8 Réactif de pulvérisation I

Mélanger des volumes égaux d'une solution de molybdate d'ammonium tétrahydraté [$(NH_4)_6MO_7O_{24}.4H_2O$] à 75 g/l et d'acide nitrique concentré, P_{20} = 1,40 g/ml dissoudre 10g d'acide tartrique dans 100 ml de ce mélange.

Préparer le réactif le jour de son utilisation.

2.9 Réactif de pulvérisation II

Dissoudre 0,5 g d'acide amino-1 naphtol-2 sulfonique-4 dans un mélange formé de 195 ml d'une solution di sulfite de sodium (métabisulfite de sodium ; $Na_2 S_2O_5$) à 150 g/l et 5 ml d'une solution de sulfite de sodium (Na_2SO_3) à 200 g/l dissoudre 40 g d'acétate de sodium trihydraté ($NaOOCCH_3.3H_2O$) dans ce mélange.

Conserver le réactif au réfrigérateur dans un flacon brun hermétiquement clos. Jeter cette solution après une semaine.

Note- Observer toutes les précautions appropriées à la mise en œuvre du mode opératoire spécifié dans la présente méthode.

3. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

3.1 Plaques de verre, soigneusement dégraissées, 10 cm x 20 cm.

3.2 Dispositif de pulvérisation, pour la préparation de couches de 0,25 mm d'épaisseur. Si un tel dispositif n'est pas disponible, des plaques prêtes à l'utilisation en couche mince de 0,25 mm d'épaisseur peuvent être utilisées à condition que l'amidon soit utilisé comme liant. Des plaques contenant du gypse (sulfate de calcium) ne conviennent pas.

3.3 Mélangeur de laboratoire.

3.4 Dessiccateur.

3.5 Hachoir mécanique à viande, type de laboratoire, muni d'une plaque perforée dont les trous ont un diamètre ne dépassant pas 4 mm.

3.6 Papier filtre plissé, de 15 cm de diamètre.

3.7 Micropipette, de 1 µl, ou **microseringue** avec vis micrométrique et bout courbé en verre.

3.8 Cuve de développement, de dimensions appropriées, avec couvercle fermant bien, en vue du développement du chromatogramme en couche mince.

3.9 Sèche-cheveux, pouvant produire soit un courant d'air à la température ambiante, soit un courant d'air tiède.

3.10 Pulvérisateur.

3.11 Etuve, réglable à 60 °C.

4. ECHANTILLON

4.1 Opérer sur un échantillon représentatif d'au moins 200 g.

4.2 Préparer l'échantillon pour essai le jour de son arrivée au laboratoire.

5. MODE OPERATOIRE

5.1 Préparation des plaques à couche mince

Dissoudre 0,3 g d'amidon (2.5) dans 90 ml d'eau bouillante. Refroidir, ajouter 15 g de poudre de cellulose (2.4) et homogénéiser dans le mélangeur de laboratoire (3.3) durant 1 min.

Appliquer ce mélange sur des plaques de verre (3.1) au moyen du dispositif de pulvérisation (3.2) et ajuster afin d'obtenir une couche de 0,25 mm.

Sécher les plaques au moyen d'un courant d'air durant 60 min à la température ambiante sans les déplacer et ensuite les chauffer durant 10 min à 100 °C.

Conserver les plaques dans le dessiccateur (3.4).

Il est également possible d'utiliser des plaques prêtes à l'utilisation en couche mince (3.2).

5.2 Préparation de l'échantillon pour essai

Rendre l'échantillon homogène par au moins deux passages dans le hachoir à viande (3.5) et par mélange. Garder l'échantillon dans un flacon fermé, étanche et rempli complètement, et le conserver, si nécessaire, au réfrigérateur. Analyser l'échantillon dès que possible après homogénéisation, mais toujours dans les 5 h.

5.3 Préparation du sérum

5.3.1 Pétrir 50 g de l'échantillon pour essai (5.2) avec 15 ml d'eau entre 40 et 60 °C dans un bécher, au moyen d'une spatule ou d'un agitateur aplati, jusqu'à l'obtention d'une masse homogène, mais en tout cas en moins de 5 min.

5.3.2 Ajouter 10 g d'acide trichloracétique (2.1) et ensuite mélanger soigneusement.

5.3.3 Placer immédiatement au réfrigérateur et l'y laisser durant 1 h, puis rassembler, sur papier filtre plissé (3.6), le sérum qui s'est séparé par décantation.

5.3.4 Si le filtrat est trouble, agiter une fois avec un égal volume d'oxyde diéthylique (2.2). Eliminer la couche éthérée au moyen d'une pipette étroite et ajouter, à la phase aqueuse, un égal volume d'éthanol (2.3). Agiter durant 1 min. Laisser reposer le mélange durant quelques minutes et filtrer sur papier filtre plissé (3.6).

5.4 Séparation par chromatographie

5.4.1 Verser le solvant de développement (2.7) dans la cuve de développement (3.8) jusqu'à une hauteur de 5 à 10 mm au-dessus du fond et fermer la cuve avec son couvercle. Laisser reposer durant, au moins, 30 min à température ambiante, à l'abri de la lumière solaire et des courants d'air.

5.4.2 Appliquer 3 µ1 du sérum, ou 6 µ1 si le mode opératoire de (5.3.4) a été utilisé pour obtenir un mélange limpide, à la couche de cellulose (5.1) sur une ligne tracée au crayon à environ 2 cm de l'extrémité. Obtenir des taches étroites en appliquant 1 µ1 à la fois.

Utiliser, pour le séchage, un courant d'air tiède produit par le sèche-cheveux (3.9).

Note- Eviter l'air chaud en raison du risque d'hydrolyse des phosphates.

5.4.3 Dans les mêmes conditions, appliquer 3 µl du mélange de référence (2.6) sur la plaque, à une distance de 1 à 1,5 cm à partir de la tache de l'échantillon, mais à exactement la même distance de l'extrémité.

5.4.4 Retirer le couvercle de la cuve et, rapidement mais avec précaution, placer la plaque de cellulose dans la cuve. Remettre immédiatement le couvercle. Développer la plaque à la température ambiante, à l'abri de la lumière solaire et des courants d'air.

5.4.5 Poursuivre le développement jusqu'à ce que le solvant ait effectué une ascension d'environ 10 cm à partir du trait de crayon. Retirer la plaque de la cuve et laisser sécher soit durant 10 min à l'étuve (3.11) réglée à 60 °C, soit durant 30 min à la température ambiante, soit au moyen d'un courant d'air.

5.5 Recherche des phosphates

5.5.1 Placer la plaque verticalement sous une hotte et pulvériser la plaque légèrement, mais de façon uniforme, au moyen du réactif de pulvérisation I (2.8).

5.5.2 Sécher la plaque au moyen d'un courant d'air tiède produit par le sèche-cheveux. Chauffer ensuite durant, au moins, 1h dans une étuve réglée à 100 °C en vue d'éliminer les dernières traces d'acide nitrique. Retirer la plaque de l'étuve et vérifier l'absence de l'odeur piquante de l'acide nitrique.

5.5.3 Laisser refroidir la plaque à la température ambiante et la replacer ensuite sous la hotte. Pulvériser la plaque légèrement, mais de façon uniforme, au moyen du réactif de pulvérisation II (2.9).

Des taches bleues apparaissent immédiatement.

Note- La pulvérisation avec le réactif II n'est pas absolument nécessaire. Cependant, les taches d'un bleu intense produites par ce réactif améliorent considérablement la détection.

6. INTERPRETATION

Comparer les distances de migration des taches de phosphate obtenues à partir de l'échantillon avec celles des phosphates du mélange de référence.

Une tache d'ortophosphate est toujours présente. Si l'échantillon contient des phosphates condensés, une tache de diphosphate et/ou des taches de phosphates à plus haut degré de polymérisation sont visibles.

Les valeurs du R_F des phosphates dans le mélange de référence sont :

— orthophosphate de 0,80 à 0,90 ;

— diphosphate (pyrophosphate) de 0,50 à 0,60 ;

— triphosphate de 0,25 à 0,35 ;

— hexamétapolyphosphate (sel de Graham) 0.

En général, les valeurs du R_F des polyphosphates dans les extraits de viandes et de produits à base de viande sont quelque peu inférieures.

Note- Les corrections pour les différences dans les valeurs du R_F des phosphates dans l'échantillon extrait et dans le mélange de référence peuvent être obtenues en plaçant, sur la même plaque, un extrait de l'échantillon de viande fraîche. Etant donné que la viande fraîche contient uniquement des monophosphates, le pourcentage de correction peut être obtenu en comparant les distances de migration de cette tache étalant avec la tache correspondante du mélange de référence.

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 23 Joumada El Oula 1435 correspondant au 25 mars 2014 rendant obligatoire la méthode de détection des agents colorants dans les viandes et les produits à base de viande par chromatographie en couche mince.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 13-312 du 5 Dhou El Kaada 1434 correspondant au 11 septembre 2013 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou El Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu le décret exécutif n° 12-214 du 23 Joumada Ethania 1433 correspondant au 15 mai 2012 fixant les modalités d'utilisation des additifs alimentaires dans les denrées alimentaires destinés à l'alimentation humaine ;

Vu l'arrêté interministériel du 19 Chaoual 1417 correspondant au 26 février 1997 relatif aux conditions de préparation et de commercialisation des merguez ;

Vu l'arrêté du 24 Rabie Ethani 1421 correspondant au 26 juillet 2000, modifié et complété, relatif aux règles applicables à la composition et à la mise à la consommation des produits carnés cuits ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de détection des agents colorants dans les viandes et les produits à base de viande par chromatographie en couche mince.

Art. 2. — Pour la détection des agents colorants dans les viandes et les produits à base de viande par chromatographie en couche mince, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet, doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 23 Joumada El Oula 1435 correspondant au 25 mars 2014.

Mustapha BENBADA.

— — — — — — — —

ANNEXE

METHODE DE DETECTION DES AGENTS COLORANTS DANS LES VIANDES ET LES PRODUITS A BASE DE VIANDE PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

1. **DOMAINE D'APPLICATION**

La présente méthode spécifie une technique de détection des agents colorants synthétiques solubles dans l'eau, dans les viandes et produits à base de viande par chromatographie en couche mince.

Les agents colorants suivants peuvent être détectés avec cette méthode :

Tartrazine

Jaune de quinoléine

Jaune-orange FCF

Amarante

Ponceau 4R

Erythrosine

Bleu Patenté V

Bleu indigo

Noir brillant PN

Noir 7984

Vert malachite FCF

Bleu VRS

2. **TERME ET DEFINITION**

Pour les besoins de la présente méthode, la définition suivante s'applique.

Détection des agents colorants

Détection de la présence ou de l'absence d'agents colorants conforme à la technique spécifiée dans la présente méthode.

3. **PRINCIPE**

Les agents colorants sont extraits d'une prise d'essai avec de l'eau chaude et absorbés sur une poudre de polyamide. Les agents colorants extraits sont purifiés par chromatographie sur colonne et les colorants sont élués de la colonne. Les agents colorants sont identifiés par chromatographie en couche mince.

4. **REACTIFS**

Sauf spécification contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

4.1 Eau, d'au moins qualité 3 ;

4.2 Ether de pétrole, intervalle d'ébullition 40 ºC à 60 ºC ;

4.3 Méthanol ;

4.4 Ammoniaque, solution aqueuse à 25 %, *p*20 = 0,910 g/ml ;

4.5 Acide acétique, fraction massique 100 %, *p*20 = 1,050 g/ml ;

4.6 Citrate trisodique dihydraté ;

4.7 Propane1-ol ;

4.8 Acétate d'éthyle ;

4.9 2- Méthyl-2-propanol ;

4.10 Acide propionique ;

4.11 Solution d'éluant pour chromatographie sur colonne.

Mélanger 95 volumes de méthanol (4.3) à 5 volumes d'ammoniaque (4.4).

4.12 Acide acétique, solution à 50 % dans du méthanol.

Mélanger 1 volume d'acide acétique (4.5) à 1 volume de méthanol (4.3) ;

4.13 Poudre de polyamide, taille des particules de 0,05 mm à 0,16 mm ;

4.14 Sable, à grains fins, lavé à l'acide chlorhydrique, neutralisé et calciné ;

4.15 Colorants étalons de référence

La pureté des colorants étalons risque de varier, il est donc nécessaire de connaître la pureté des colorants

NOTE : Les colorants alimentaires certifiés peuvent aussi être utilisés comme étalons.

4.16 Solutions étalons de référence pour chromatographie en couche mince.

Constituer avec de l'eau des solutions séparées de chacun des colorants étalons de référence (4.15) à une concentration de colorant étalon d'environ 1 g/l.

Préparer les solutions de bleu indigo le jour même de leur utilisation. D'autres solutions peuvent se conserver pendant, au moins, 3 mois lorsqu'elles sont stockées dans le noir (les solutions d'érythrosine se conservent pendant 1 mois).

4.17 Eluant pour chromatographie en couche mince : solution 1.

Peser, à 0,1 g près, 25 g de citrate trisodique dihydraté (4.6) dans une fiole jaugée à un trait de 1000 ml. Dissoudre dans de l'eau, diluer avec de l'eau jusqu'au trait et mélanger.

Mélanger 80 volumes de cette solution de citrate à 20 volumes d'ammoniaque diluée (4.4) et à 12 volumes de méthanol (4.3).

De manière à éviter ou à réduire les perturbations dues au saffleur ou au safran, il est recommandé d'utiliser la solution chromatographique II (4.18).

4.18 Eluant pour chromatographie en couche mince : solution II.

Mélanger 6 volumes de propan-1-ol (4.7) à 1 volume d'acétate d'éthyle (4.8) et à 3 volumes d'eau.

4.19 Eluant pour chromatographie en couche mince : solution III.

Mélanger 50 volumes de 2-méthyl-2-propanol (4.9) à 12 volumes d'acide propionique (4.10) et à 38 volumes d'eau.

5. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire et, notamment, les éléments suivants :

5.1 Equipement mécanique ou électrique capable d'homogénéiser l'échantillon pour laboratoire,

Ceci inclut une machine de découpe rotative à vitesse élevée et un hacheur équipé d'une plaque dont les ouvertures ont un diamètre inférieur ou égal à 4 mm.

5.2 Tubes de centrifugeuse, en verre, d'une contenance de 75 ml.

5.3 Fioles à fond plat, d'une contenance de 250 ml, à bouchon en verre rodé.

5.4 Fioles à fond rond, d'une contenance de 100 ml, avec rodage.

5.5 Centrifugeuse, fonctionnant avec une accélération radiale d'environ 2 000 *gn.*

5.6 Evaporateur rotatif

5.7 Colonne de chromatographie, en verre, équipée d'un filtre fritté et d'un robinet, longueur environ 20 cm, diamètre environ 30 mm, taille des pores du filtre de 40 µm à 100 µm.

Mettre de la laine de verre dans la colonne et ajouter 1 g à 2 g de sable (4.14).

5.8 Récipient en plastique, d'un volume d'environ 10 ml, avec couvercle.

5.9 Plaques de chromatographie en couche mince, recouvertes d'une couche de poudre cellulosique d'une épaisseur de 0,10 mm ou équivalent.

Des plaques du type prêtes à l'emploi peuvent être utilisées.

5.10 Micropipettes, d'une contenance d'environ 5 µl.

5.11 pH-mètre, précis à 0,1 unité de pH près.

6. ECHANTILLIONNAGE

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon qui soit réellement représentatif et n'ait pas été endommagé ou modifié lors du transport ou de l'entreposage.

Partir d'un échantillon représentatif d'au moins 200 g. Entreposer l'échantillon de manière à empêcher tout endommagement ou changement de composition.

7. PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI

Homogénéiser l'échantillon à l'aide de l'équipement approprié (5.1). Veiller à ce que la température de la matière de l'échantillon ne s'élève pas au-dessus de 25 °C. Si l'on utilise un hachoir, faire passer l'échantillon dans l'équipement, au moins, deux fois.

Remplir un récipient approprié, étanche à l'air, avec l'échantillon préparé. Fermer le récipient et l'entreposer de manière à éviter tout endommagement ou changement de composition de l'échantillon. Analyser l'échantillon dès que les conditions pratiques le permettent, mais toujours dans un délai de 24 h après l'homogénéisation.

8. MODE OPERATOIRE

Remarques :

1. Si l'échantillon contient de l'indigo, la température ne doit, à aucun moment de l'analyse, dépasser 35 °C. Le bleu indigo se décompose partiellement dans la solution chromatographique l, c'est pourquoi on doit utiliser la solution II.

2. L'érythrosine est sensible à la lumière. Lorsque l'analyse se trouve interrompue, les solutions et les plaques doivent être entreposées dans le noir. Ceci est également valable pour l'indigo.

8.1 Prise d'essai

Peser, à 0,1 g près, 5 g de l'échantillon pour essai préparé (7) dans un tube de centrifugeuse (5.2).

Pour les échantillons gras, procéder conformément à (8.2).

Pour les échantillons non gras, procéder conformément à (8.3).

8.2 Echantillons gras

Ajouter environ 20 ml d'éther de pétrole (4.2) dans le tube de centrifugeuse et mélanger avec une baguette de verre. Décanter l'éther de pétrole.

Renouveler cette opération trois fois.

8.3 Echantillons non gras

Ajouter 25 ml d'eau bouillante (8) et mélanger.

Ajouter 25 ml de solution d'éluant (4.11).

Vérifier que le pH,est de 9 ± 0,5 en utilisant le pH-mètre (5. 11) Si ce n'est pas le cas, ajuster le pH avec de l'acide acétique (4.5) ou de l'ammoniaque diluée (4.4).

Bien mélanger. Mettre l'échantillon à refroidir dans un congélateur pendant 15 min (pour empêcher la turbidité).

Centrifuger (5.5) pendant 10 min avec une accélération radiale d'environ 2 000 *gn.*

Décanter la solution claire dans une fiole à fond plat (5.3). Pour le bleu indigo, utiliser une fiole à fond rond (5.4).

Ajouter 5 ml d'eau au tube de centrifugeuse contenant le résidu. Mélanger et ajouter 10 ml de solution d'éluant (4.11). Mélanger et centrifuger comme indiqué ci-dessus.

Renouveler l'opération jusqu'à ce que tout le colorant soit extrait de l'échantillon et combiner tous les extraits.

Evaporer l'extrait combiné sur un bain-marie jusqu'à environ 25 ml de manière à éliminer le méthanol. Pour l'indigo, utiliser une fiole à fond rond (5.4) et l'évaporateur rotatif (5.6) à 35 °C.

Ajouter 25 ml d'eau bouillante (8) et mélanger.

8.4 Transfert des colorants sur la poudre de polyamide

Avec l'acide acétique (4.5), ou l'ammoniaque diluée (4.4), ajuster le pH entre 4 et 5.

Ajouter 1 g de poudre de polyamide (4.13) à la solution tiède (8). Secouer vigoureusement pendant 1 min.

Laisser la poudre sédimenter.

Vérifier qu'il ne reste pas de colorant dans la solution. Si la solution est colorée, ajouter un peu plus de poudre de polyamide et secouer vigoureusement.

NOTE : Certains colorants naturels ne sont pas complètement absorbés par la poudre de polyamide, laissant une solution colorée même quand tous les colorants synthétiques ont été entièrement absorbés. Il est en général possible de décider en fonction du type d'échantillon si ces colorants naturels sont présents ou non.

Secouer et transférer la solution tiède en suspension dans la colonne de chromatographie (5.7).

Rincer la fiole à fond plat avec trois volumes d'eau chaude de 10 ml chacun (8) et ajouter les trois volumes de rinçage, un par un, à la colonne. Laver à nouveau la colonne à trois reprises avec des volumes d'eau chaude de 10 ml (8) et pour finir la laver à trois reprises avec trois volumes de méthanol (4.3) de 5 ml.

Si les colorants naturels sont élués, poursuivre le lavage de la colonne avec du méthanol (4.3) jusqu'à ce que le méthanol élué soit devenu incolore.

8.5 Elution et concentration des colorants isolés

Placer une fiole à fond rond (5.4) sous la colonne et éluer les colorants de la poudre de polyamide en utilisant des volumes de solution d'éluant (4.11) de 5 ml, à un débit d'élution de 2 ml/min, jusqu'à ce que le polyamide soit devenu incolore.

Evaporer l'éluat jusqu'à séchage complet à l'aide de l'évaporateur (5.6) à une température de 35 °C maximum (8)

Ajouter 1 ml ou 2 ml de solution d'éluant (4.11) en fonction de la quantité et du nombre de colorants, et dissoudre le résidu. Transférer la solution colorée dans un récipient en plastique (5.8).

8.6 Séparation chromatographique en couche mince

8.6.1 Plaques étalons de référence

Préparer trois plaques de chromatographie en couche mince étalons de référence. Avec une micropipette (5.10), déposer sur chacune des plaques (5.9) une goutte d'environ 5 µI (diamètre < 5 mm) de chaque solution étalon (4.16). Laisser celles-ci développer séparément, chacune des plaques avec un éluant chromatographique (4.17, 4.18 et 4.19), dans une cuve non saturée jusqu'à ce que le front du solvant se trouve à environ 10 cm à 12 cm de la ligne de départ. Retirer les plaques de la cuve et les sécher à l'air sous une cloche de protection. Entreposer les plaques dans le noir. Les gouttes, à l'exception de l'indigo, sont stables pendant plusieurs années.

8.6.2 Echantillons

Avec une micropipette (5.10), déposer sur une plaque de chromatographie en couche mince (5.9) une quantité juste visible de solution d'échantillon (8.5). Sécher avec un sèche-cheveux. Pour l'indigo, sécher à l'air.

Développer la plaque dans une cuve non saturée à une hauteur d'environ 10 cm à 12 cm en utilisant une solution chromatographique appropriée (4.17, 4.18 ou 4.19), c'est-à-dire la solution qui permet d'obtenir la séparation des colorants la meilleure dans l'échantillon (1).

Il est parfois nécessaire de préparer une deuxième plaque échantillon et de la développer dans l'un ou l'autre des éluants pour obtenir la séparation la meilleure possible.

Retirer la plaque de la cuve et la sécher à l'air sous une cloche de protection.

Comparer les gouttes d'échantillons à la plaque étalon de référence appropriée (8.6.1).

Il est recommandé d'utiliser différentes quantités de solutions d'échantillons dans le cas où les colorants sont mélangés, car les colorants en présence peuvent avoir des concentrations différentes.

Les produits résiduels sont en général provoqués par une purification inadéquate. Si tel est le cas, adsorber le colorant à nouveau avec l'absorbant, laver à l'eau chaude et éliminer l'absorbant comme décrit précédemment.

8.7 Confirmation

Confirmer l'identité des colorants par chromatographie du concentré (8.6.2) lorsque les étalons sont mélangés pour les colorants identifiés avec le premier chromatogramme.

En cas de doute, éluer le colorant de la plaque avec une solution neutre (eau ou éthanol, ou solution d'acétate d'ammonium à 0,2 g/I), un acide (acide chlorhydrique à 0,1 mol/I) et une solution alcaline (solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 mol/I) et comparer le spectre d'absorption du colorant à celui de l'étalon. Se reporter aux spectres d'absorbance des agents colorants cités en (1).

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DU COMMERCE

DIRECTION GÉNÉRALE DU CONTRÔLE
ÉCONOMIQUE ET DE LA RÉPRESSION
DES FRAUDES

Direction des Laboratoires d'Essais
et d'Analyses de la Qualité

MÉTHODES OFFICIELLES D'ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES RELATIVES AUX CORPS GRAS D'ORIGINE ANIMALES ET VÉGÉTALES

Sommaire

1. Arrêté du 29 Mai 2011 relatif à la méthode de préparation de l'échantillon dans les corps gras d'origine animale et végétale. (JO n° 64 - 2011)	01
2. Arrêté du 29 Mai 2011 relatif à la méthode de détermination de l'indice de saponification dans les corps gras d'origine animale et végétale. (JO n° 64 - 2011)	02
3. Arrêté du 29 Mai 2011 relatif à la méthode de détermination de l'indice de peroxyde des corps gras d'origine animale et végétale. (JO n° 64 - 2011)	04
4. Arrêté du 27 Juin 2011 relatif à la méthode de détermination de la teneur en eau et en matières volatiles des corps gras d'origine animale et végétale. (JO n° 65 - 2012)	08
5. Arrêté du 27 Juin 2011 relatif à la méthode de détermination de la teneur en impuretés insolubles dans les corps gras d'origine animale et végétale. (JO n° 65 - 2012)	10
6. Arrêté du 27 Juin 2011 relatif à la méthode de détermination de l'indice de réfraction des corps gras d'origine animale et végétale. (JO n° 65 - 2012)	12
7. Arrêté du 3 Août 2011 relatif à la méthode de détermination de la teneur en chlorure de sodium dans les corps gras d'origine animale et végétale. (JO n° 66- 2012)	14
8. Arrêté du 3 Août 2011 relatif à la méthode de détection rapide de la présence d'un seul anti-oxygène dans les corps gras d'origine animale et végétale. (JO n° 66- 2012)	15
9. Arrêté du 3 Août 2011 relatif à la méthode de détermination de la densité relative à 20 °C des corps gras d'origine animale et végétale. (JO n° 66- 2012)	17
10. Arrêté du 21 Août 2011 relatif à la méthode de détermination de l'indice d'acide et d'acidité des corps gras d'origine animale et végétale. (JO n° 68 - 2012)	19
11. Arrêté du 21 Août 2011 relatif à la méthode de détermination de l'indice d'iode dans les corps gras d'origine animale et végétale. (JO n° 9 - 2013)	24

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 26 Joumada Ethania 1432 correspondant au 29 mai 2011 rendant obligatoire la méthode de préparation de l'échantillon des corps gras d'origine animale et végétale.

— — — —

Le ministre du commerce ;

Vu le décret présidentiel n° 10-149 du 14 Joumada Ethania 1431 correspondant au 28 mai 2010 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02- 453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05 - 465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 21 Chaâbane 1419 correspondant au 10 décembre 1998 relatif aux spécifications techniques des beurres et aux modalités de leur mise à la consommation ;

Vu l'arrêté interministériel du 2 Dhou El Hidja 1422 correspondant au 14 février 2002 fixant la liste des additifs autorisés dans les denrées alimentaires ;

Arrête :

Article ler. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de préparation de l'échantillon des corps gras d'origine animale et végétale.

Art. 2. — Pour la préparation de l'échantillon des corps gras d'origine animale et végétale, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 26 Joumada Ethania 1432 correspondant au 29 mai 2011.

Mustapha BENBADA.

— — — — — — — —

ANNEXE

METHODE DE PREPARATION DE L'ECHANTILLON DES CORPS GRAS D'ORIGINE ANIMALE ET VEGETALE

1. PRINCIPE

Homogénéisation par agitation de la matière grasse, rendue liquide si nécessaire par chauffage à une température appropriée. S'il y a lieu, séparation des substances insolubles par filtration, et élimination de l'eau par séchage à l'aide de sulfate de sodium anhydre.

2. REACTIFS

Sulfate de sodium, anhydre.

3. APPAREILLAGE

3.1 Etuve à chauffage électrique, réglable.

3.2 Entonnoir à filtration, chauffant.

4. MODE OPERATOIRE

4.1 Homogénéisation et filtration.

4.1.1 Echantillon fluide, limpide et sans sédiment.

Rendre l'échantillon pour laboratoire le plus homogène possible par agitation du récipient maintenu fermé.

4.1.2 Echantillon fluide, trouble ou contenant des sédiments.

4.1.2.1 Pour la détermination de la teneur en toutes sortes d'impuretés volatiles et/ou insolubles, agiter énergiquement le récipient qui contient l'échantillon pour laboratoire jusqu'à ce que les sédiments se soient complètement détachés des parois du récipient et soient uniformément répartis au sein de l'huile. Vérifier qu'il ne reste pas de sédiments sur les parois du récipient, s'il en reste, les détacher complètement (ouvrir le récipient si nécessaire) et les incorporer soigneusement avec toute l'huile.

4.1.2.2 Pour toutes les autres déterminations, introduire le récipient contenant l'échantillon pour laboratoire dans l'étuve (3.1) réglée à 5O°C, l'y maintenir jusqu'à ce que l'échantillon ait atteint cette température et procéder ensuite comme indiqué en 4.1.1. Si, à la suite du chauffage et du mélange, l'échantillon n'est pas parfaitement limpide, filtrer l'huile en opérant à l'intérieur de l'étuve maintenue à 50° C ou à l'aide de l'entonnoir à filtration chauffant (3.2). Eviter des temps de séjour dans l'étuve plus longtemps qu'il est nécessaire, de façon à éviter toute modification du corps gras par oxydation ou polymérisation. Le filtrat obtenu doit être parfaitement limpide.

4.1.3 Echantillon concret

4.1.3.1 Pour la détermination de la teneur en toutes sortes d'impuretés volatiles et/ou insolubles, et pour toutes les déterminations relatives à l'état d'oxydation du corps gras, chauffer avec précaution l'échantillon pour laboratoire jusqu'à ce qu'il commence à être liquide et malaxer énergiquement afin de le rendre aussi homogène que possible.

4.1.3.2 Pour toutes les autres déterminations, faire fondre l'échantillon pour laboratoire en le maintenant dans l'étuve (3.1) réglée à une température supérieure d'au moins l0°C à la température de fusion du corps gras en question. Si à la suite du chauffage, l'échantillon est parfaitement limpide, procéder comme indiqué en (4.1.1), s'il est trouble ou s'il contient un sédiment, le filtrer à la température adoptée en opérant à l'intérieur de l'étuve ou à l'aide de l'entonnoir à filtration chauffant (3.2).

Le filtrat obtenu doit être parfaitement limpide.

4.2 Séchage

Si l'échantillon homogénéisé contient encore de l'eau (en particulier dans le cas des huiles acides, des acides gras des corps gras concrets), il doit, pour les déterminations dont les résultats peuvent être influencés par une présence d'eau (par exemple indice d'iode), être préalablement séché en prenant toutes les précautions utiles pour éviter son oxydation.

Dans ce but, maintenir le moins longtemps possible, dans l'étuve (3.1) réglée à une température supérieure d'au moins de 10°C à la température de fusion, de préférence sous azote une partie de l'échantillon homogénéisé (4.1.1), (4.1.2) ou (4.1.3), selon le cas, après avoir ajouté du sulfate de sodium anhydre à raison de 1 à 2 g pour 10 g de corps gras.

Ne jamais sécher à une température dépassant 50°C.

Note :

Le sulfate de sodium perd sa propriété d'agent déshydratant à des températures dépassant 32,4° C. Il peut donc être nécessaire de sécher sous pression réduite. Les corps gras pour lesquels il est nécessaire d'avoir une température de dessiccation supérieure à 50 °C doivent être dissous dans un solvant et ensuite séchés.

Agiter vigoureusement l'échantillon chauffé avec le sulfate de sodium anhydre, puis filtrer. Si le corps gras se solidifie en refroidissant, opérer à l'intérieur de l'étuve ou à l'aide d'un entonnoir à filtration chauffant (3.2), à une température appropriée qui ne doit jamais dépasser 50°C.

5. CONSERVATION : il convient de conserver les échantillons dans des conditions appropriées en tenant compte de la nature de chaque échantillon concerné et des essais à effectuer.

———★———

Arrêté du 26 Joumada Ethania 1432 correspondant au 29 mai 2011 rendant obligatoire la méthode de détermination de l'indice de saponification des corps gras d'origine animale et végétale.

———

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 10-149 du 14 Joumada Etania 1431 correspondant au 28 mai 2010 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou El Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 21 Chaâbane 1419 correspondant au 10 décembre 1998 relatif aux spécifications techniques des beurres et aux modalités de leur mise à la consommation ;

Vu l'arrêté interministériel du 2 Dhou El Hidja 1422 correspondant au 14 février 2002 fixant la liste des additifs autorisés dans les denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de l'indice de saponification des corps gras d'origine animale et végétale.

Art. 2. — Pour la détermination de l'indice de saponification des corps gras d'origine animale et végétale, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 26 Joumada Ethania 1432 correspondant au 29 mai 2011.

Mustapha BENBADA.

— — — — — — — —

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE L'INDICE DE SAPONIFICATION DES CORPS GRAS D'ORIGINE ANIMALE ET VEGETALE

La présente méthode spécifie une technique pour la détermination de l'indice de saponification des corps gras d'origine animale et végétale. L'indice de saponification est une caractéristique des acides gras libres et estérifiés présents dans l'échantillon analysé.

1. TERME ET DEFINITION

Pour les besoins de la présente méthode, le terme et la définition suivants s'appliquent.

Indice de saponification : nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire pour saponifier 1 g de matière grasse dans les conditions spécifiées dans la présente méthode.

2. PRINCIPE

Ebullition à reflux échantillon avec une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium, puis titrage de l'excès d'hydroxyde de potassium, par une solution titrée d'acide chlorhydrique,

3. REACTIFS

Utiliser uniquement des réactifs de qualité reconnue et de l'eau déminéralisée ou de l'eau de pureté au moins équivalente.

3.1 Hydroxyde de potassium, solution c (KOH) = 0,5 mol/l dans l'éthanol à 95 % (fraction volumique).

Cette solution doit être incolore ou jaune paille. Une solution stable et incolore peut être obtenue selon l'un des modes opératoires suivants :

a) - Faire bouillir à reflux 1 litre d'éthanol avec 8g d'hydroxyde de potassium et 5g de copeaux d'aluminium, durant 1 h, puis distiller immédiatement. Dissoudre dans le distillat la quantité requise d'hydroxyde de potassium (à peu près 35g). Laisser reposer pendant plusieurs jours, puis décanter le liquide clair surnageant dans un flacon en verre brun pour le séparer du carbonate de potassium déposé.

b) - Ajouter 4g de tert-butoxyde d'aluminium à 1 litre d'éthanol et laisser le mélange reposer pendant plusieurs jours.

Décanter le liquide surnageant et dissoudre dans ce liquide la quantité requise d'hydroxyde de potassium. Laisser reposer pendant plusieurs jours, puis décanter le liquide clair surnageant dans un flacon en verre brun pour le séparer du carbonate de potassium déposé.

3.2 Acide chlorhydrique, solution titrée c (HCL) = 0,5 mol/I.

3.3 Phénolphtaléine, solution à (p = 0,1g/100ml) Dans l'éthanol à 95 % (fraction volumique).

3.4 Bleu alcalin 6b, solution à (p =2,5g/100ml) dans l'éthanol à 95% (fraction volumique),

3.5 Régularisateurs d'ébullition.

4. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit.

4.1 Fiole conique de capacité 250 ml, en verre résistant aux alcalis, à col rodé.

4.2 Réfrigérant à reflux, avec rodage en verre adaptable à la fiole conique (4.1).

4.3 Dispositif de chauffage (par exemple bain d'eau, plaque électrique chauffante, ou tout autre appareil approprié).

Ne pas utiliser de flamme nue.

4.4 Burette, de capacité 50 ml, graduée en 0,1 ml ou burette automatique.

4.5 Pipette, de capacité 25 ml ou **pipette automatique**.

4.6 Balance analytique.

5. ECHANTILLONNAGE

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif, n'ayant pas été endommagé ou modifié pendant le transport ou l'entreposage.

6. PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI

Mélanger les échantillons pour essai et les filtrer soigneusement s'il y a des impuretés visibles.

7. MODE OPERATOIRE

7.1 Prise d'essai

Peser, à 5 mg près, environ 2 g d'échantillon pour essai (article 6) dans une fiole conique (4.1),

La prise d'essai de 2g a été déterminée sur la base d'indice de saponification de 170 à 200. Pour d'autres indices de saponification, il convient de modifier la masse de façon à neutraliser la moitié environ de la solution éthanoïque d'hydroxyde de potassium. Les recommandations concernant la masse de la prise d'essai sont présentées au tableau 1.

Tableau 1 – Masse de la prise d'essai

Indice de saponification prévu	Masse de la prise d'essai
150 à 200	2,2g à 1,8g
200 à 250	1,7g à l,4g
250 à 300	1,3g à 1,2g
Supérieur à 300	1,l g à l,0g

7.2 Détermination

7.2.1 Ajouter, à la prise d'essai, à l'aide de la pipette (4.5), 25 ml de la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (3.1) et quelques régularisateurs d'ébullition (3.5) .Relier le réfrigérant à reflux (4.2) à la fiole, placer la fiole sur le dispositif de chauffage (4.3) et faire bouillir doucement, en agitant de temps en temps, pendant 60 minutes, sauf pour les corps gras à point de fusion élevé, difficiles à saponifier, pour lesquels le temps d'ébullition doit être de deux heures (2 h).

7.2.2 Ajouter, à la solution chaude, de 0,5 à 1 ml de la solution de phénolphtaléine (3.3) et titrer avec l'acide chlorhydrique (3.2) jusqu'à disparition de la couleur rose de l'indicateur. Si la solution est fortement colorée, utiliser 0,5 ml à 1 ml de solution de bleu alcalin (6b) (3.4).

7.3 Essai à blanc

Effectuer un essai à blanc en suivant le même mode opératoire qu'en (7.2), en utilisant également 25,0 ml de la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (3.1), mais en omettant la prise d'essai.

8. EXPRESSION DES RESULTATS

L'indice de saponification est égal à :

$$Is = \frac{(V_O - V_1) \times c \times 56,1}{m}$$

où :

V_O : est le volume, en millilitres, de l'acide chlorhydrique (3.2), utilisé pour essai à blanc ;

V_1: est le volume, en millilitres, de l'acide chlorhydrique (3.2), utilisé pour la détermination ;

c : est la concentration exacte, d'acide chlorhydrique (3.2) ;

m : est la masse, en grammes, de la prise d'essai (7.1).

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations, si les conditions de répétabilité (9.2) sont remplies.

Donner le résultat sous forme de nombre entier.

9. REPETABILITE

La différence absolue entre deux résultats individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même appareillage dans un court intervalle de temps, n'excédera que dans 5% des cas au plus la limite de répétabilité.

10. REPRODUCTIBILITE

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans des laboratoires différents par des opérateurs différents utilisant des appareillages différents, n'excédera que 5% des cas au plus la limite de reproductibilité,

Arrêté du 26 Joumada Ethania 1432 correspondant au 29 mai 2011 rendant obligatoire la méthode de détermination de l'indice de péroxyde des corps gras d'origine animale et végétale.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 10-149 du 14 Joumada Etania 1431 correspondant au 28 mai 2010 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 21 Chaâbane 1419 correspondant au 10 décembre 1998 relatif aux spécifications techniques des beurres et aux modalités de leur mise à la consommation ;

Vu l'arrêté interministériel du 2 Dhou El Hidja 1422 correspondant au 14 février 2002 fixant la liste des additifs autorisés dans les denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de l'indice de péroxyde des corps gras d'origine animale et végétale.

Art. 2. — Pour la détermination de l'indice de péroxyde des corps gras d'origine animale et végétale, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 26 Joumada Ethania 1432 correspondant au 29 mai 2011.

Mustapha BENBADA.

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE L'INDICE DE PEROXYDE DES CORPS GRAS D'ORIGINE ANIMALE ET VEGETALE

(Détermination avec point d'arrêt iodométrique)

1 - TERME ET DEFINITION :

Pour les besoins de la présente méthode, le terme et la définition suivants s'appliquent.

Indice de péroxyde (IP) :

Quantité de substances de l'échantillon, exprimée en termes d'oxygène actif, qui oxydent l'iodure de potassium dans les conditions spécifiées dans la présente méthode.

Note : L'indice de péroxyde est généralement exprimé en miliéquivalents (méq) d'oxygène actif par kilogramme d'huile, mais il peut également être exprimé (en unités SI) en millimoles (mmol) d'oxygène actif par kilogramme d'huile. La valeur en mmol d'oxygène actif par kilogramme représente la moitié de la valeur exprimée en méq d'oxygène actif par kilogramme. L'indice de peroxyde (méq d'oxygène actif par kilogramme) multiplié par la masse équivalente d'oxygène actif (égale à 8) est égale à la quantité d'oxygène en milligrammes par kilogramme d'huile.

2 - PRINCIPE

Découdre l'échantillon d'essai dans de l'iso-octane et de l'acide acétique glacial, puis ajouter l'iodure de potassium. Déterminer visuellement l'iode libéré par les peroxydes, à l'aide d'un indicateur à l'amidon et d'une solution étalon de thiosulfate de sodium. Déterminer visuellement la fin du titrage.

3 - REACTIFS

Sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue. Tous les réactifs doivent être exempts d'oxygène dissous.

3.1 Eau, déminéralisée, bouillie et refroidie à 20°c.

3.2 Acide acétique glacial, fraction massique de 100%, dégazé dans une cuve à ultrasons sous vide ou purgé sous courant de gaz inerte pur et sec (dioxyde de carbone ou azote).

3.3 Iso - octane, dégazé dans une cuve à ultrasons sous vide ou purgé sous courant de gaz inerte pur et sec (dioxyde de carbone ou azote).

3.4 Mélange d'acide acétique glacial/iso-octane, préparé en mélangeant 60 ml d'acide acétique glacial et 40 ml d'iso-octane (fraction volumique d'acide acétique glacial : densité, p = 60ml/l00ml, fraction volumique d'iso-octane: densité, p = 40ml/l00ml).

Le mélange est dégazé dans une cuve à ultrasons sous vide ou purgé sous courant de gaz inerte pur et sec (dioxyde de carbone ou azote).

3.5 Iodure de potassium, exempt d'iode et d'iodates.

3.6 Solution d'iodure de potassium saturée, concentration massique = 175g/100ml, dissoudre environ 14g d'iodure de potassium dans environ 8g d'eau récemment portée à ébullition et revenue à température ambiante.

Veiller à maintenir la solution à l'état saturé (cristaux non dissous). La conserver à l'abri de la lumière et en préparer une nouvelle chaque jour. Contrôler la solution par l'essai suivant : ajouter deux gouttes de solution d'amidon à 0,5 ml d'iodure de potassium dans 30 ml de solution d'acide acétique glacial/iso-octane. Si la formation d'une couleur bleue nécessite plus d'une goutte de solution étalon de thiosulfate de sodium 0,1 mol/1, éliminer la solution d'iodure de potassium.

3.7 Solution étalon de thiosulfate de sodium 0,1 N, C ($Na_2 S_2 O_3$) = 0,1 mol/l.

Pour la préparation de cette solution, utiliser uniquement de l'eau récemment portée à ébullition, si possible purgée avec de l'azote. Cette solution peut être utilisée pendant un mois et conservée dans un flacon en verre ambré.

3.8 Solution étalon de thiosulfate de sodium 0,01 N, C ($Na_2 S_2 O_3$) = 0,01 mol/1 (7.2).

Il est nécessaire de préparer fraîchement cette solution à partir de la solution étalon à 0,1 mol/1 de thiosulfate de sodium préparée précédemment, ou bien d'en déterminer le titre tous les jours. L'expérience montre que la stabilité est limitée et dépend de la valeur du pH et de la teneur en dioxyde de carbone libre. Utiliser uniquement de l'eau récemment portée à ébullition, si possible purgée avec de l'azote.

3.9 Solution d'amidon, concentration massique =1g/l00ml. Mélanger 0,5 g d'amidon dans une petite quantité d'eau froide. Ajouter ensuite ce mélange à 50 ml d'eau bouillante tout en remuant, laisser bouillir quelques secondes, puis laisser immédiatement refroidir.

Une nouvelle solution doit être préparée chaque jour.

Il est recommandé d'utiliser de l'amidon de pomme de terre pour la iodométrie, étant donné que cet amidon permet d'obtenir un bleu plus foncé. Des réactifs équivalents peuvent être utilisés.

3.10 Etalon d'iodore de potassium (KIO_3), matériel de référence.

3.11 Acide chlorhydrique, c(HCL) = 4 mol/l.

4 - APPAREILLAGE

4. Appareillage courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit :

4.1 Erlenmeyer, de 250 ml, à col rodé et muni d'un bouchon en verre rodé.

4.2 Burette, d'une capacité de 10 ml ou 25 ml, graduée au moins tous les 0,05 ml, dotée de préférence d'un système de mise à zéro automatique.

4.3 Unité de dosage manuel ou automatique, de 20 ml de capacité, avec une résolution d'au moins 10 µI et une précision de ± 0,15 % (par exemple une burette à piston).

4.4 Pipettes, de 0,5 ml, Iml, I0ml, (ou pipettes automatiques).

4.5 Eprouvettes graduées, de 50 ml et 100 ml .

4.6 Balance analytique ; lecture à 0,001 g près.

4.7 Agitateur magnétique, doté d'un barreau aimanté (de 2,5 cm) et d'une plaque chauffante.

4.8 Fiole jaugée, de 1000 ml.

4.9 Fiole jaugée, de 250 ml.

4.10 Fiole jaugée, de 500 ml.

4.11 Four à micro-ondes.

Il est possible d'utiliser un four à micro-ondes pour fondre rapidement et facilement les échantillons solides. L'utilisation d'un four à micro-ondes n'entraînera pas d'augmentation de l'indice de peroxyde, s'il est utilisé avec précaution et de manière appropriée. Les conditions adaptées doivent être vérifiées par des essais préalables.

5 - ECHANTILLONAGE

Il convient qu'un échantillon représentatif ait été envoyé au laboratoire. Il convient qu'il n'ait été ni endommagé ni modifié lors du transport ou de l'entreposage.

6 - PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI

La prise d'essai destinée à la détermination de l'indice de peroxyde doit être prélevée en priorité et l'indice de peroxyde doit être déterminé immédiatement.

Homogénéiser l'échantillon, de préférence sans chauffage et à l'abri de l'air. Eviter tout rayonnement solaire direct. Chauffer avec précaution les échantillons solides à 10° C au dessus de leur point de fusion. Les échantillons ayant des impuretés visibles doivent être filtrés.

Pour certains produits, la quantité extraite de corps gras ou d'huile peut être inférieure à 5 g ou l'indice de peroxyde du corps gras supérieur à 30 méq d'oxygène actif par kilogramme. Dans ces cas- là, il convient que l'utilisateur choisisse une prise d'essai plus faible.

7 - MODE OPERATOIRE

7.1 Généralités

Suivre toutes les étapes à la lumière du jour diffuse ou à la lumière artificielle. Eviter toute exposition directe aux rayons du soleil. Veiller à ce que tous les récipients soient exempts de composés oxydants ou réducteurs.

Conserver les solutions étalons de thiosulfate de sodium dans des flacons en verre ambré.

7.2 Préparation et détermination du titre de la solution étalon de thiosulfate de sodium 0,01N

7.2.1 Préparation de la solution étalon de thiosulfate de sodium 0,01 N

A l'aide d'une pipette (4.4) transvaser 100 ml de la solution étalon de thiosulfate de sodium 0,1 N(3.7) dans une fiole jaugée de 1000 ml (4.8) . Compléter au trait de jauge avec de l'eau récemment portée à ébullition (3.1) Après homogénéisation, transvaser la solution étalon de thiosulfate de sodium 0,01N obtenue dans un flacon en verre ambré.

Chaque jour, préparer fraîchement la solution étalon de thiosulfate de sodium 0,01 N à partir de la solution de l'étalon de thiosulfate de sodium 0,1 N préparée précédemment, ou bien déterminer le titre. L'expérience montre que la stabilité est limitée et dépend de la valeur du PH et de la teneur en dioxyde de carbone libre. Utiliser uniquement de l'eau récemment portée à ébullition, si possible purgée avec de l'azote.

7.2.2 Détermination du titre de la solution étalon de thiosulfate de sodium 0,01 N (détermination du facteur)

Peser, à 0,001 mg près, 0,27 g à 0,33 g d'iodate de potassium (KIO_3) dans une fiole jaugée (250 ml ou 500 ml) (4.9 ou 4.10) , puis remplir au trait de jauge de l'eau (3.1) récemment portée à ébullition, puis refroidie à température ambiante.

A l'aide d'une pipette (4.4) transférer 5 ml ou 10 ml de cette solution d'iodate de potassium dans un erlenmeyer de 250 ml (4.1). Ajouter 60 ml d'eau récemment portée à ébullition, 5ml d'HCL 4mol/1 (3.11) et 25 mg à 50 mg d'iodure de potassium (3.5) ou 0,5 ml de la solution saturée de potassium (3.6).

Titrer cette solution en utilisant la métbode iodométrique (visuelle) afin de déterminer le facteur de la solution étalon de thiosulfate de sodium 0,01 N (7.2.1) .

Calculer la concentration exacte, C stand, de la solution étalon de thiosulfate de sodium 0,01 N à l'aide de l'équation suivante :

$$C\ stand = \frac{mKIO_3 \times V_1 \times 6 \times 1000 \times Pkio3}{mKIO_3 \times V_2 \times V_3 \times Cthio \times 100}$$

Où :

m_{KIO3} : est la masse d'iodate de potassium, en grammes ;

6 : est la masse équivalente du titre (1 mol KIO_3 = 3 mol_2,) ;

V_1 : est le volume de la solution d'iodate de potassium utilisé pour la détermination du titre (5 ml ou 10 ml) ;

V_2 : est le volume total de la solution d'iodate de potassium, en millilitres (250 ml ou 500 ml) ;

V_3 : est le volume de la solution étalon de thiosulfate de sodium 0,01 N utilisé pour la détermination en millilitres ;

P K03 : est la concentration massique de l'iodate de potassium, en grammes pour 100 g ;

MK103 est la masse moléculaire de l'iodate de potassium (214 g/mol) ;

Cthio : Est la concentration de la solution étalon de thiosulfate de sodium 0,01N, en moles par litre (= 0,01).

7.3 Détermination de l'indice de peroxyde

7.3.1 Purger l'erlenmeyer (4.1) préalablement nettoyée avec soin sous courant d'azote ou de dioxyde de carbone. y Peser à 1 mg près :

a) Une prise d'essai de 5,0 ± 0,1 g pour des indices de peroxyde attendus entre 1 et 30 ; ou

b) Une prise d'essai de 10,0 ± 0,1 g pour des indices de peroxyde attendus entre 0 et 1.

Avant utilisation, rincer l'erlenmeyer avec la solution d'acide acétique glacial/iso- octane (3.4) pour qu'il ne contienne plus aucune substance oxydante ou réductrice.

7.3.2 Dissoudre la prise d'essai dans 50 ml de la solution d'acide acétique glacial iso - octane en remuant doucement.

Pour les matières grasses de points de fusion élevés (graisses solides et animales), ajouter avec soin 20 ml d'iso - octane (3.3) à la graisse fondue en remuant doucement, puis ajouter immédiatement 30 ml d'acide acétique glacial (3.2) .Chauffer également l'échantillon après dilution si nécessaire.

7.3.3 Ajouter 0,5 ml de la solution saturée d'iodure de potassium (3.6), boucher l'erlenmeyer puis mélanger à l'aide d'un agitateur magnétique (4.7) en évitant qu'un tourbillon trop important ne se forme, ou bien manuellement sans entrée d'air, pendant exactement 60 s (utiliser un chronomètre précis à ± 1 s) .

7.3.4 Ouvrir la fiole conique, ajouter immédiatement 100 ml d'eau déminéralisée, rincer le bouchon en verre rodé et agiter.

7.3.5 Titrer immédiatement l'iode libéré avec la solution étalon de thiosulfate de sodium 0,01 N (3.8) pour passer de couleur jaune orangée à jaune pâle, ajouter alors 0,5 ml de la solution d'amidon (3.9) ; poursuivre le titrage pour passer du violet à l'incolore. Arrêter le titrage dès que la solution est incolore pendant 30 s.

Note 1: La phase titrée est la phase inférieure. Avec la solution étalon de thiosulfate de sodium 0,01 N (3.8), il est nécessaire d'attendre 15 s à 30 s de voir la couleur changer.

Note 2 : Pour les indices de peroxyde inférieurs à 1, la solution d'amidon peut être ajoutée au début du titrage.

7.3.6 Dans un essai à blanc parallèle, un volume de solution de thiosolfate 0,01 N inférieur ou égal à 0,1 ml doit être utilisé. Si l'essai à blanc nécessite un volume supérieur, remplacer la solution saturée d'iodure de potassium car elle pourrait ne pas convenir.

8. CALCUL ET EXPRESSION DES RESULTATS

L'ndice de peroxyde (IP) en méq d'oxygène actif par kilogramme est calculé à l'aide de l'equation suivante :

$$IP = \frac{(V - V_O) \times Cthio \times Cstand \times 1000}{m}$$

Où:

V : est le volume de la solution étalon de thiosulfate de sodium 0,01N utilisé pour la détermination, en millilitres ;

V_O : est le volume de la solution étalon de thiosulfate de sodium 0,01N utilisé pour l'essai à blanc, en millilitres;

C_{stand} : est la concentration exacte de la solution étalon de thiosulfate de sodium 0,01 N, déterminée selon 7.2, en moles par litre.

C_{thio} : est la concentration approximative de la solution étalon de thiosulfate de sodium 0,01 N , en moles par litre (= 0,01) ;

m : est la masse de la prise d'essai, en grammes.

Le résultat de la détermination doit être indiqué à une décimale près.

———★———

ARRETES, DECISIONS ET AVIS

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 25 Rajab 1432 correspondant au 27 juin 2011 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en eau et en matières volatiles des corps gras d'origine animale et végétale.

— — — —

Le ministre du commerce ;

Vu le décret présidentiel n°10-149 du 14 Joumada Ethania 1431 correspondant au 28 mai 2010 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n°02- 453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05 - 465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 21 Chaâbane 1419 correspondant au 10 décembre 1998 relatif aux spécifications techniques des beurres et aux modalités de leur mise à la consommation ;

Vu l'arrêté interministériel du 2 Dhou El Hidja 1422 correspondant au 14 février 2002 fixant la liste des additifs autorisés dans les denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de la teneur en eau et en matières volatiles des corps gras d'origine animale et végétale.

Art. 2. — Pour la détermination de la teneur en eau et en matières volatiles des corps gras d'origine animale et végétale, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 25 Rajab 1432 correspondant au 27 juin 2011.

Mustapha BENBADA.

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE LA TENEUR EN EAU ET EN MATIERES VOLATILES DES CORPS GRAS D'ORIGINE ANIMALE ET VEGETALE

1- METHODE DE DETERMINATION

Deux méthodes de détermination, par séchage, de la teneur en eau et en matières volatiles des corps gras d'origine animale et végétale sont décrites ci-après :

— **Méthode A,** utilisant un bain de sable ou une plaque chauffante.

— **Méthode B**, utilisant une étuve de séchage.

La méthode A est applicable à tous les corps gras.

La méthode B est applicable seulement aux corps gras non siccatifs et ayant un indice d'acide inférieur à 4. En aucun cas, les huiles lauriques ne doivent être analysées selon cette méthode.

2- DEFINITION

Teneur en eau et en matières volatiles : perte de masse subie par le produit après chauffage à 103°C ± 2°C, dans les conditions de la présente méthode et exprimée en pourcentage en masse.

3- PRINCIPE

Chauffage d'une prise d'essai à 103°C ± 2°C jusqu'à l'élimination complète de l'eau et des matières volatiles et détermination de la perte de masse.

4- METHODE A

4.1 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

4.1.1 Balance analytique

4.1.2 Capsule en porcelaine ou en verre, à fond plat, 80 à 90 mm de diamètre et d'environ 30 mm de profondeur.

4.1.3 Thermomètre, gradué d'environ 100 mm de longueur et muni de réservoir à mercure renforcé et d'une chambre de pression à la partie supérieure.

4.1.4 Bain de sable ou plaque chauffante.

4.1.5 Dessiccateur, garni d'un agent déshydratant.

4.2 Mode opératoire

4.2.1 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la méthode officielle.

4.2.2 Prise d'essai

Peser, à 0.001 g près, environ 20 g de l'échantillon (4.2.1) dans la capsule (4.1.2) préalablement séchée, pesée avec le thermomètre.

4.2.3 Détermination

Chauffer la capsule contenant la prise d'essai (4.2.2) sur le bain de sable ou sur la plaque chauffante (4.1.4). suivant la température du produit d'environ 10°C/min jusque vers 90°C et en agitant constamment avec le thermomètre.

Réduire la vitesse d'élévation de la température en observant la vitesse de dégagement des bulles de vapeur qui se détachent du fond de la capsule, et laisser la température monter jusqu'à 103°C ± 2°C. Ne pas dépasser 105°C. Poursuivre l'agitation en raclant le fond de la capsule jusqu'au moment où tout dégagement de bulles cesse.

Pour s'assurer que toute l'eau s'est évaporée, répéter plusieurs fois le chauffage à 103°C ± 2°C, en refroidissant à 95°C entre les périodes de chauffage.

Laisser ensuite refroidir la capsule avec le thermomètre dans le dessiccateur (4.1.5) jusqu'à la température ambiante et peser à 0,001g près. Répéter ces opérations jusqu'à ce que la différence entre les résultats de deux pesées successives ne dépasse pas 2 mg.

4.2.4 NOMBRE DE DETERMINATIONS

Effectuer deux déterminations sur des prises d'essai provenant du même échantillon pour essai (4.2.1)

5. METHODE B

5.1 Appareillage

Matériel courant de laboratoire.

5.1.1 Balance analytique.

5.1.2 Vase en verre, à fond plat, d'environ 50 mm de diamètre et d'environ 30 mm de hauteur.

5.1.3 Etuve à chauffage électrique, réglable à 103° C ± 2°C.

5.1.4 Dessiccateur, garni d'un agent déshydratant efficace.

5.2 Mode opératoire

5.2.1 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la méthode officielle.

5.2.2 Prise d'essai

Peser, à 0.001g près, environ 5 ou 10g de l'échantillon pour essai (5.2.1), selon la teneur présumée en eau et en matières volatiles, dans le vase (5.1.2) préalablement séché et taré.

5.2.3 Détermination

Maintenir le vase contenant la prise d'essai (5.2.2) durant 1h dans l'étuve (5.1.3) réglée à 103°C.

Laisser refroidir dans le dessiccateur (5.1.4) jusqu'à la température ambiante et peser à 0.001g près.

Répéter les opérations de chauffage, de refroidissement et de pesée, mais avec des séjours successifs dans l'étuve de 30 min chacun, jusqu'à ce que la perte de masse entre deux pesées successives ne dépasse pas 2 ou 4 mg, selon la masse de la prise d'essai.

NOTE :

Une augmentation de la masse de la prise d'essai après un chauffage répété indique qu'une auto-oxydation du corps gras a eu lieu. Dans ce cas, prendre pour le calcul du résultat la masse minimale trouvée ou utiliser de préférence la méthode A.

5.2.4 Nombre de déterminations

Effectuer deux déterminations sur les prises d'essai provenant du même échantillon pour essai (5.2.1).

6. EXPRESSION DES RESULTATS

La teneur en eau et en matières volatiles, exprimée en pourcentage en masse, est égale à :

$$\frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

Où :

m_0 : est la masse, en grammes, de la capsule (4.1.2) et du thermomètre (4.1.3) ou du vase en verre (5.1.2).

m_1 : est la masse en grammes, de la capsule, du thermomètre et de la prise d'essai (4.2.2), ou du vase de la prise d'essai (5.2.2), avant chauffage.

m_2 est la masse en grammes, de la capsule du thermomètre et du résidu (4.2.3), ou du vase et du résidu (5.2.3), après chauffage.

Remarque

Dans le cas de la méthode B, remplacer la capsule (4.1.2) par le vase en verre (5.1.2).

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations si la condition de répétabilité (7) est remplie.

Donner les résultats avec deux décimales.

7. REPETABILITE

La différence entre les résultats de deux déterminations, effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre par le même analyste, ne doit pas dépasser 0,05 g d'eau et de matières volatiles pour 100 g d'échantillon.

Arrêté du 25 Rajab 1432 correspondant au 27 juin 2011 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en impuretés insolubles dans les corps gras d'origine animale et végétale.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 10-149 du 14 Joumada Ethania 1431 correspondant au 28 mai 2010 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02- 453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou El Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 21 Chaâbane 1419 correspondant au 10 décembre 1998 relatif aux spécifications techniques des beurres et aux modalités de leur mise à la consommation ;

Vu l'arrêté interministériel du 2 Dhou El Hidja 1422 correspondant au 14 février 2002 fixant la liste des additifs autorisés dans les denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de la teneur en impuretés insalubres dans les corps gras d'origine animale et végétale.

Art. 2. — Pour la détermination de la teneur en impuretés insolubles dans les corps gras d'origine animale et végétale, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 25 Rajab 1432 correspondant au 27 juin 2011.

Mustapha BENBADA.

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE LA TENEUR EN IMPURETES INSOLUBLES DANS LES CORPS GRAS D'ORIGINE VEGETALE ET ANIMALE

1. DEFINITION :

Teneur en impuretés insolubles.

Quantité de poussières et autres matières étrangères insolubles dans le n-hexane ou l'éther de pétrole, dans les conditions spécifiées dans la présente méthode.

La teneur est exprimée en pourcentage en masse.

Ces impuretés comprennent des impuretés mécaniques, des matières minérales, des hydrates de carbone, des matières azotées, diverses résines, des savons de calcium, des acides gras oxydés, des lactones d'acides gras et (en partie) des savons alcalins, des hydroxy-acides gras et leurs glycérides.

2. PRINCIPE :

Traitement d'une prise d'essai par un excès de n-hexane ou d'éther de pétrole puis filtration de la solution obtenue. Lavage du filtre et du résidu avec le même solvant. Séchage à 103°C ±2°C puis peser.

3. REACTIFS :

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

3.1 n. hexane ou à défaut, **éther de pétrole** ayant un intervalle de distillation compris entre 30°C et 60°C et ayant un indice de brome inférieur à 1.

Le résidu à l'évaporation complète ne doit pas être, pour les deux solvants, supérieur à 0,002 g pour 100 ml.

3.2 kieselguhr, purifié, calciné, de perte de masse de 0,2 %, après chauffage à 900°C (chauffé au rouge).

4. APPAREILLAGE :

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit :

4.1 Balance analytique , précise à ± 0,001g près.

4.2 Etuve à chauffage électrique, réglable à 103 °C ± 2°C.

4.3 Fiole conique, 250 ml de capacité avec bouchon en verre rodé.

4.4 Dessiccateur, garni d'un agent déshydratant efficace.

4.5 Papier-filtre sans cendres (teneur maximale en cendres de 0,01 %, en masse), indice de rétention de 98%, en masse, pour particules de dimensions supérieures à 2,5 μm^1, ou filtre en fibre de verre équivalent, de 120 mm de diamètre, ainsi qu'un vase en métal (aluminium de préférence) ou en verre muni d'un couvercle bien adapté. (variante à 4.6, pour tous les produits, sauf les huiles acides).

4.6 Creuset filtrant, en verre, de qualité P16 (ouverture de pores de 10µm à 16µm), d'un diamètre de 40 mm et de 50 ml de capacité, et fiole à filtrer. (Variante à 4.5 incluant les corps acides).

4.7 Etuve, à chauffage électrique, pouvant fonctionner à 103° C ± 2° C.

5. ECHANTILLONNAGE :

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

6. PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI :

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la méthode de préparation de l'échantillon.

7. MODE OPERATOIRE :

7.1 Prise d'essai :

Peser, à 0,01g près, environ 20 g de l'échantillon pour essai dans la fiole conique (4.3).

7.2 Détermination :

7.2.1 Sécher soit le papier-filtre, le vase et son couvercle, soit le creuset filtrant (4.6) dans l'étuve (4.2) réglée à 103°C. Laisser refroidir dans le dessiccateur (4.4) et peser à 0,001g près.

7.2.2 Ajouter 200 ml de n-hexane ou éther de pétrole (3.1) dans la fiole contenant la prise d'essai (7.1), boucher la fiole et agiter.

Pour l'huile de ricin, la quantité de solvant peut être augmentée afin de faciliter l'opération et il peut être nécessaire d'utiliser une fiole de plus grande capacité.

Laisser reposer à une température voisine de 20°C durant environ 30 min.

7.2.3 Filtrer sur le papier-filtre placé dans un entonnoir approprié, ou sur le creuset filtrant en utilisant, si nécessaire, une légère aspiration.

Laver le papier-filtre ou le creuset filtrant en versant de petites portions du même solvant qu'en (7.2.2) mais avec la quantité strictement nécessaire pour que le dernier filtrat soit exempt de matières grasses. Chauffer le solvant, si nécessaire, jusqu'à une température maximale de 60°C afin de dissoudre toutes les matières grasses solidifiées sur le filtre.

7.2.4 Si on s'est servi d'un papier-filtre, le retirer de l'entonnoir, le disposer dans le vase, laisser s'évaporer à l'air la majeure partie du solvant restant sur le filtre et terminer l'évaporation dans l'étuve réglée à 103°C. Retirer de l'étuve, fermer le vase avec son couvercle : laisser refroidir dans le dessiccateur (4.4) et peser à 0,001g près.

7.2.5 Si on s'est servi d'un creuset filtrant, laisser s'évaporer à l'air la majeure partie du solvant restant sur le creuset et terminer l'opération dans l'étuve réglée à 103°C. Retirer de l'étuve, laisser refroidir dans le dessiccateur (6.4) et peser à 0,001 g près.

7.2.6 Si on désire déterminer la teneur en impuretés organiques, il est nécessaire d'utiliser un papier-filtre sans cendres, préalablement séché et pesé. Dans ce cas, le papier-filtre contenant les impuretés insolubles devra être incinéré et la masse de cendres obtenues devra être soustraite de la masse des impuretés insolubles.

La teneur en impuretés organiques, exprimée en pourcentage en masse, devra être alors calculée en multipliant cette différence de masse par $100/m_0$, où m_0 est la masse, en grammes, de la prise d'essai.

7.2.7 Si on analyse des huiles acides, garnir le creuset filtrant avec du Kieselguhr (3.2) comme suit. Dans un Bécher en verre de 100ml, préparer un mélange avec 2 g de Kieselguhr et environ 30 ml d'éther de pétrole (3.1). Verser le mélange dans un creuset filtrant, sous pression réduite, afin d'obtenir une couche de Kieselguhr sur le filtre en verre.

Sécher le creuset filtrant en verre ainsi préparé dans l'étuve (4.2) réglée à 103°C, pendant 1 h. Laisser refroidir dans le dessiccateur (4.4) et peser à 0,001g près.

8. EXPRESSION DES RESULTATS :

La teneur en impuretés insolubles, exprimée en pourcentage en masse, est égale à :

$$W = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \times 100$$

Où

m_0 est la masse, en grammes, de la prise d'essai (7.1)

m_1 est la masse, en grammes, du vase et de son couvercle et du papier-filtre ou du creuset filtrant (7. 1).

m_2 est la masse, en grammes, du vase et de son couvercle et du papier-filtre contenant le résidu sec (7.2.1) ou du creuset filtrant et du résidu sec (7.2.5).

Donner les résultats avec deux décimales.

9. REPETABILITE :

La différence absolue entre deux résultats d'essais individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans le même appareillage dans un court intervalle de temps, n'excédera que dans 5% des cas au plus une valeur de 0,01g d'impuretés par 100g d'échantillon ne contenant pas plus de 0,10% (en masse) d'impuretés insolubles.

10. REPRODUCTIBILITE :

La différence absolue entre deux résultats d'essais individuels, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans des laboratoires différents par des opérateurs différents utilisant des appareillages différents, n'excédera que, dans 5% des cas au plus, une valeur de 0,06g d'impuretés par 100g d'échantillon ne contenant pas plus de 0,10 % (en masse) d'impuretés insolubles.

Arrêté du 25 Rajab 1432 correspondant au 27 juin 2011 rendant obligatoire la méthode de détermination de l'indice de réfraction des corps gras d'origine animale et végétale.

———

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 10-149 du 14 Joumada Ethania 1431 correspondant au 28 mai 2010 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 21 Chaâbane 1419 correspondant au 10 décembre 1998 relatif aux spécifications techniques des beurres et aux modalités de leur mise à la consommation ;

Vu l'arrêté interministériel du 2 Dhou El Hidja 1422 correspondant au 14 février 2002 fixant la liste des additifs autorisés dans les denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de l'indice de réfraction des corps gras d'origine animale et végétale.

Art. 2. — Pour la détermination de l'indice de réfraction des corps gras d'origine animale et végétale, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 25 Rajab 1432 correspondant au 27 juin 2011.

Mustapha BENBADA.

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE L'INDICE DE REFRACTION DES CORPS GRAS D'ORIGINE ANIMALE ET VEGETALE

1. DEFINITION :

L'indice de réfraction d'une substance est le rapport de la vitesse de la lumière à une longueur d'onde définie dans le vide à sa vitesse dans la substance.

En pratique, la vitesse de la lumière dans l'air est utilisée à la place de celle dans le vide et la longueur d'onde choisie est, sauf indication contraire, celle de la moyenne des raies D du sodium (589.6 nm).

L'indice de réfraction d'une substance donnée varie avec la longueur d'onde de la lumière incidente et avec la température.

La notation est n^t_D où t est la température en degrés celsius.

2. PRINCIPE :

Mesurage à l'aide d'un réfractomètre convenable de l'indice de réfraction de l'échantillon liquide à une température constante.

3. REACTIFS :

3.1 α-Bromonaphtalène, ou laurate d'éthyle, de qualité pour réfractomètre et d'indice de réfraction connu. $CH_3(CH_2)_4$ à 20°C (N_D 1,4119).

3.2 Trichloréthylène, ou autres solvants tels que hexane, éther de pétrole acétone, toluène, pour le nettoyage du prisme du réfractomètre.

4. APPAREILLAGE :

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

4.1 Réfractomètre, par exemple type ABBE, susceptible de déterminer l'indice de réfraction à ± 0.0001 près entre n_D =1,3000 et n_D = 1,7000.

Ce réfractomètre doit être ajusté de façon à donner, à la température de 20°C pour l'eau distillée, un indice de 1,3330.

4.2 Source de lumière : Lampe à vapeur de sodium.

La lumière blanche peut être utilisée si le réfractomètre est équipé d'un système de compensation achromatique.

La lame de verre, d'indice de réfraction connu.

4.3 Bain d'eau, réglable à la température à laquelle les mesures sont à effectuer (cas des échantillons solides).

5. ECHANTILLONNAGE :

L'échantillonnage se fait dans des conditions appropriées.

6. MODE OPERATOIRE :

6.1 Préparation de l'échantillon pour essai :

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la méthode officielle.

L'indice de réfraction doit être déterminé sur le corps gras parfaitement anhydre et filtré.

Dans le cas d'un échantillon solide, transférer l'échantillon préparé dans un récipient convenable et le placer dans le bain d'eau (4.5), réglé à la température à laquelle les mesurages sont à effectuer. Laisser un temps suffisant pour que la température de l'échantillon se stabilise.

6.2 Réglage de l'appareil :

Vérifier le réglage du réfractomètre (4.1) en mesurant l'indice de réfraction de la lame de verre (4.3) selon les instructions du fabricant ou en mesurant l'indice de réfraction de l'**α**-bromonaphtalène ou du laurate d'éthyle (3.1).

6.3 Détermination :

Mesurer l'indice de réfraction de l'échantillon aux températures suivantes :

a) 20°C pour les corps gras complètement liquides à cette température ;

b) 40°C pour les corps gras complètement fondus à cette température;

c) 50°C pour les corps gras complètement fondus à cette température mais pas à 40°C ;

d) 60°C pour les corps gras complètement fondus à cette température mais pas à 50°C ;

e) 80°C ou plus pour les autres corps gras totalement hydrogénés ou des cires.

Maintenir la température du prisme du réfractomètre à la valeur constante nécessaire au moyen d'une circulation d'eau assurée par le bain d'eau (4.4) réglé à 0,1°C près.

Contrôler la température de l'eau sortant du réfractomètre en utilisant un thermomètre de précision convenable. Immédiatement avant le mesurage, abaisser la partie mobile du prisme en position horizontale. Essuyer la surface du prisme d'abord avec un chiffon doux, ensuite avec un tampon d'ouate mouillé par quelques gouttes de solvant (3.2).

Effectuer les mesurages conformément aux instructions opératoires de l'appareil utilisé.

Lire l'indice de réfraction à 0,0001 près en valeur absolue et noter la température du prisme de l'appareil.

Immédiatement après le mesurage, essuyer la surface du prisme avec un chiffon doux, puis avec un tampon d'ouate mouillé après quelques gouttes de solvant (3.2).

Mesurer deux autres fois l'indice de réfraction et calculer la moyenne arithmétique des trois mesurages.

6.4 Nombre de déterminations :

Effectuer deux déterminations sur des prises d'essai provenant du même échantillon pour essai.

7. EXPRESSION DES RESULTATS :

7.1 Mode de calcul et formules :

Si la différence entre la température de mesurage t_1 et la température de référence t est inférieure à 3°C, l'indice de réfraction n_D^t à la température de référence t est donné par la formule :

a) Si $t_1 > t$

$$n_D^t = n_D^{t1} + (t_1 - t) F$$

b) Si $t_1 < t$

$$n_D^t = n_D^{t1} + (t - t_1) F$$

où :

t_1 : est la température de mesurage ;

t : est la température de référence ;

F : est le facteur de correction, fonction de la température, égale à :

0,00035 pour t = 20°C, pour les huiles ;

0,00036 pour t = 40°C, t = 50°C, t = 60°C pour les graisses concrètes et les mélanges d'acides gras ;

0,00037 pour t = 80°C ou plus, pour les cires.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des valeurs obtenues pour les deux déterminations (5.4) si la condition de répétabilité (6.2) est remplie.

Noter le résultat arrondi à la quatrième décimale.

Note

Dans l'expression des résultats, il faut tenir compte du fait que la présence d'acides gras libres abaisse fortement l'indice de réfraction.

Si l'indice d'acide est 2, ajouter 0,000045 par unité d'indice d'acide.

7.2 Répétabilité :

La différence entre les valeurs obtenues pour les deux déterminations (5.4) effectuées rapidement l'une après l'autre par le même analyste, ne doit pas dépasser 0,0002 unité d'indice de réfraction. Sinon, répéter les déterminations.

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 3 Ramadhan 1432 correspondant au 3 août 2011 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en chlorure de sodium dans les corps gras d'origine animale et végétale.

———

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 10-149 du 14 Joumada Ethania 1431 correspondant au 28 mai 2010 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou El Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 21 Chaâbane 1419 correspondant au 10 décembre 1998 relatif aux spécifications techniques des beurres et aux modalités de leur mise à la consommation ;

Vu l'arrêté interministériel du 2 Dhou El Hidja 1422 correspondant au 14 février 2002 fixant la liste des additifs autorisés dans les denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de la teneur en chlorure de sodium dans les corps gras d'origine animale et végétale.

Art. 2. — Pour la détermination de la teneur en chlorure de sodium dans les corps gras d'origine animale et végétale, les laboratoires de contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 3 Ramadhan 1432 correspondant au 3 août 2011.

Mustapha BENBADA.

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE LA TENEUR EN CHLORURE DE SODIUM DANS LES CORPS GRAS D'ORIGINE ANIMALE ET VEGETALE

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente méthode de détermination de la teneur en chlorure de sodium est applicable à toutes les margarines.

2. PRINCIPE

Après avoir fait fondre la margarine par l'adjonction d'eau bouillante, on titre les chlorures du mélange avec une solution titrée de nitrate d'argent, en présence de chromate de potassium comme indicateur, selon la méthode de Mohr.

3. REACTIFS

Les réactifs utilisés doivent être de qualité analytique reconnue.

3.1 Solution titrée de nitrate d'argent, 0,l N.

3.2 Solution de chromate de potassium à 5 % (m /v) dans l'eau distillée.

4. APPAREILLAGE

4.1 Balance analytique

4.2 Erlenmeyers, d'une capacité de 250 ml.

4.3 Burette, graduée en dixième de millilitre (1/10).

5. MODE OPERATOIRE

5. 1 Préparation de l'échantillon

Ramollir l'échantillon dans un récipient clos en le chauffant sur un bain-marie à une température aussi faible que possible pour ne pas rompre l'émulsion.

Agiter fréquemment le récipient contenant l'échantillon durant le processus de ramollissement afin de mélanger avec soin l'échantillon.

Retirer le récipient du bain-marie et agiter énergiquement à intervalles fréquents jusqu'à ce que l'échantillon soit refroidi et ait pris la consistance d'une crème épaisse. On peut se servir d'un agitateur mécanique.

5.2 Essai à blanc

Faire un essai à blanc en employant les mêmes réactifs dans les mêmes proportions et en suivant le même mode opératoire que celui décrit à l'alinéa (5.3), à l'exclusion de l'échantillon.

5.3 Dosage

Peser à 0,01g près approximativement 5g de l'échantillon dans l'erlenmeyer. Ajouter avec précaution 100 ml d'eau distillée bouillante. Laisser reposer 5 à 10 minutes, en agitant de temps à autre, jusqu'à ce que le mélange atteigne 50 à 55 °C (température de dosage). Ajouter 2 ml de la solution de chromate de potassium (3.2). Mélanger en agitant. Tout en continuant d'agiter, titrer avec la solution de nitrate d'argent (3.1) jusqu'à ce que le virage à la couleur rouge brique persiste pendant trente secondes (30s).

6. EXPRESSION DES RESULTATS

La teneur en chlorure de sodium (exprimée en pourcentage m/m de NaCl) est donnée par la formule suivante:

$$\frac{5{,}85.(V_1 - V_0).N}{m_0}$$

Où :

V_0 est le volume, en millilitres, de la solution de nitrate d'argent utilisée pour l'essai à blanc.

V_1 est le volume, en millilitres, de la solution de nitrate d'argent utilisée pour la prise d'essai.

N est la normalité de la solution de nitrate d'argent.

m_0 est la masse, en grammes, de la prise d'essai.

Arrondir le résultat à 0,01 % près.

7. REPETABILITE

La différence entre les résultats de deux déterminations parallèles (résultats obtenus simultanément ou rapidement l'un après l'autre par le même analyste) ne doit pas excéder 0,02 g de chlorure de sodium pour 100 g de produit.

———★———

Arrêté du 3 Ramadhan 1432 correspondant au 3 août 2011 rendant obligatoire la méthode de détection rapide de la présence d'un seul anti-oxygène dans les corps gras d'origine animale et végétale.

———

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 10-149 du 14 Joumada Ethania 1431 correspondant au 28 mai 2010 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02- 453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou El Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 21 Chaâbane 1419 correspondant au 10 décembre 1998 relatif aux spécifications techniques des beurres et aux modalités de leur mise à la consommation ;

Vu l'arrêté interministériel du 2 Dhou El Hidja 1422 correspondant au 14 février 2002 fixant la liste des additifs autorisés dans les denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détection rapide de la présence d'un seul anti-oxygène dans les corps gras d'origine animale et végétale.

Art. 2. — Pour la détection rapide de la présence d'un seul anti-oxygène dans les corps gras d'origine animale et végétale, les laboratoires de contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 3 Ramadhan 1432 correspondant au 3 août 2011.

Mustapha BENBADA.

— — — — — — — —

ANNEXE

METHODE DE DETECTION RAPIDE DE LA PRESENCE D'UN SEUL ANTI-OXYGENE DANS LES CORPS GRAS D'ORIGINE ANIMALE ET VEGETALE

1. DEFINITION :

La présente méthode expérimentale décrit trois techniques rapides de détection de la présence ou de l'absence d'un anti-oxygène dans les corps gras d'origine animale et végétale.

Ces techniques sont applicables respectivement : au butylhydroxyanisol (BHA), au butyl-hydroxy-toluène (BHT), aux gallates, lorsqu'un seul de ces anti-oxygènes est supposé présent et connu d'avance.

2. METHODE DE DETECTION DU BHA

2.1 PRINCIPE :

Après dissolution éventuelle de la prise d'essai dans l'hexane, extraction du BHA à l'aide d'une solution éthanolique et formation d'un complexe de coloration bleue avec le dichloro-2,6 p.benzoquinone-4 chloroimide en présence de borax.

2.2 REACTIFS :

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique et l'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau de pureté au moins équivalente.

2.2.1 n-hexane.

2.2.2 Ethanol, solution à 30% (V/V).

2.2.3 Dichloro-2,6 p.benzoquinone-4 chloroimide

2.2.4 Borax (tétraborate de sodium), solution à 20 g/l.

2.3 APPAREILLAGE :

Tubes à essai.

2.4 MODE OPERATOIRE :

2.4.1 Prise d'essai :

Peser à 0,5g près, dans un tube à essai (2.3), 4 g de l'échantillon de corps gras.

2.4.2 Détection :

Si la matière grasse est concrète, dissoudre la prise d'essai à l'aide de 10 ml d'hexane (2.2.1). Ajouter 15ml de la solution éthanolique (2.2.2), puis 2 ml de la solution de borax (2.2.4) et quelques cristaux (environ 0,05 g) de dichloro-2.6 benzoquinone-4-chloroimide (2.2.3) agiter en retournant plusieurs fois le tube à essai.

La phase aqueuse se colore en bleu au bout de 10 mn environ en présence du BHA.

2.5 LIMITE DE DETECTION :

La limite de détection se situe vers 50 mg/kg (ppm) de BHA.

3. METHODE DE DETECTION DU BHT

3.1 PRINCIPE :

Extraction du BHT par l'acétonitrile pur. Formation, en présence de dianisidine et de nitrite de sodium, d'un complexe de coloration rose qui est extrait par le chloroforme.

3.2 REACTIFS :

Les réactifs doivent être de qualité analytique et l'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de qualité équivalente.

3.2.1 Chloroforme

3.2.2 Acétonitrile

3.2.3 Dianisidine (diméthoxy-3, 3; diamino-4, 4 diphényle)

Peser environ 200 mg de dianisidine dans une fiole jaugée de 100 ml et les dissoudre dans 40 ml de méthanol. Compléter au trait-repère avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique N.

Cette solution se conserve quelques jours à l'abri de la lumière.

3.2.4 Nitrite de sodium, solution à 3g /l

3.2.5 Corps gras non oxydé

3.3 APPAREILLAGE :

3.3.1 Fioles coniques de 50 ml avec bouchons.

3.3.2 Tubes à essai

3.3.3 Eprouvette de 10 ml

3.4 MODE OPERATOIRE :

3.4.1 Prise d'essai :

Peser à 1g près, dans une fiole conique de 50 ml (3.3.1), 10g de l'échantillon de corps gras.

3.4.2 Détection :

Ajouter à la prise d'essai, avec une éprouvette (3.3.3), 5 ml d'acétonitrile (3.2.2). Boucher et agiter vigoureusement. Laisser décanter et refroidir.

Verser le surnageant dans un tube à essai (3.3.2) et ajouter successivement 5 ml de la solution de dianisidine (3.2.3) et 2 ml de la solution de nitrite de sodium (3.2.4), Agiter. Il apparaît une coloration orangée dans tous les cas, même en l'absence d'anti-oxygène. Ajouter alors 2 ml de chloroforme (3.2.1) et agiter à nouveau.

La présence de BH'I' se traduit par une coloration rose plus ou moins intense de la phase chloroforme que l'on devra comparer à celle de l'essai à blanc (3.4.3).

3.4.3 Essai à blanc :

Effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions opératoires mais en utilisant comme prise d'essai un corps gras non oxydé (3.2.5). On observe parfois une très légère coloration, ce qui rend cet essai nécessaire.

3.5 LIMITE DE DETECTION :

La limite de détection se situe vers 10 mg / kg (ppm) de BHT.

4. METHODE DE DETECTION DES GALLATES

4.1 PRINCIPE :

Mise en solution d'une prise d'essai dans l'hexane. Formation avec les gallates d'un complexe de coloration rose en présence d'hydroxyde d'ammonium concentré.

4.2 REACTIFS :

Les réactifs doivent être de qualité analytique, et l'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de qualité équivalente.

4.2.1 n-hexane

4.2.2 Hydroxyde d'ammonium concentré

4.3 APPAREILLAGE :

Fiole conique de 50 ml.

4.4 MODE OPERATOIRE :

4.4.1 Prise d'essai :

Peser, à 0,5g près, dans une fiole conique de 50 ml (4.3), 5g de l'échantillon de corps gras.

4.4.2 Détection :

Dissoudre la prise d'essai à l'aide de 20 ml d'hexane (4.2.1). Ajouter 10 ml d'hydroxyde d'ammonium concentré (4.2.2) et agiter modérément.

La phase ammoniacale se colore en rose en présence de gallates. La coloration est d'autant moins intense que la masse molaire des gallates est plus élevée.

4.5 LIMITE DE DETECTION :

La limite de détection se situe vers 50 mg/kg (ppm) de gallates.

———★———

Arrêté du 3 Ramadhan 1432 correspondant au 3 août 2011 rendant obligatoire la méthode de détermination de la densité relative à 20°C des corps gras d'origine animale et végétale.

———

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 10-149 du 14 Joumada Etania 1431 correspondant au 28 mai 2010 portant nomination des membres du Gouvernement;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou El Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 21 Chaâbane 1419 correspondant au 10 décembre 1998 relatif aux spécifications techniques des beurres et aux modalités de leur mise à la consommation ;

Vu l'arrêté interministériel du 2 Dhou El Hidja 1422 correspondant au 14 février 2002 fixant la liste des additifs autorisés dans les denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de la densité relative à 20°C des corps gras d'origine animale et végétale.

Art. 2. — Pour la détermination de la densité relative à 20°C des corps gras d'origine animale et végétale, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 3 Ramadhan 1432 correspondant au 3 août 2011.

Mustapha BENBADA.

— — — — — — — —

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE LA DENSITE RELATIVE A 20°C DES CORPS GRAS D'ORIGINE ANIMALE ET VEGETALE

1. DEFINITION

La densité relative à une température de 20°C d'une huile ou d'une graisse est le quotient de la masse dans l'atmosphère d'un certain volume de cette huile ou à une température donnée t par la masse du même volume d'eau à 20°C, les pesées étant faites avec les poids ajustés de façon à équilibrer les poids de laiton dans l'air.

2. MODE OPERATOIRE

Etalonner comme suit, une fiole à densité relative ou un pycnomètre (de 25ml au moins de capacité) : nettoyer et sécher la fiole, puis la peser ; la remplir d'eau distillée récemment bouillie et refroidie et la plonger dans un bain d'eau à la température de 20°C jusqu'à ce qu'elle atteigne cette température.

Si l'on utilise une fiole, mettre en place le bouchon de telle manière que le tube capillaire soit complètement rempli d'eau, puis maintenir le tout à 20°C jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de variation de volume. Essuyer le bouchon. Si l'on utilise un pycnomètre, ajuster au trait le niveau du liquide.

Retirer la fiole ou le pycnomètre du bain, l'essuyer extérieurement, laisser reposer quelque temps et peser.

Vider et sécher la fiole ou le pycnomètre. Le remplir avec la prise d'essai d'huile ou de graisse précédemment amenée au voisinage de la température de 20°C.

Maintenir la fiole ou le pycnomètre dans un bain réglé à 20°C jusqu'à ce qu'elle atteigne cette température. Si l'on utilise une fiole, mettre en place le bouchon de telle manière que le tube capillaire soit complètement rempli d'huile ou de matière grasse, puis maintenir le tout à la température de 20°C jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de variation de volume.

Essuyer le bouchon. Si l'on utilise un pycnomètre, ajuster au trait le niveau de l'huile ou de la graisse.

Retirer l'appareil du bain, le sécher extérieurement, le laisser reposer pendant un peu de temps et le peser. Faire toutes les pesées dans l'air avec des poids ajustés de manière à équilibrer les poids de laiton dans l'air.

3. CALCUL ET EXPRESSION DES RESULTATS

Densité relative à t/20°C dans l'air

$$\frac{m_2}{m_1\ [\ (1 + \alpha + (t - 20°)\ ]}$$

où :

m_2 : masse en grammes de l'huile ou de la graisse utilisée pour l'examen.

m_1 : masse en grammes de l'eau utilisée dans le test d'étalonnage.

t : température ambiante.

α **:** est le coefficient de dilatation cubique du verre à la température donnée. Il est égal à :

0.00003 pour le verre normal.

0.00001 pour le verre au borosilicate.

4. NOTE

Sous réserve que la stéarine ne se sépare absolument pas de l'huile ou de la graisse à une température proche de 20°C et que l'huile ou la graisse ne contiennent aucune quantité visible d'humidité ou d'impuretés, la densité relative peut être déterminée à n'importe quelle température située entre (t ± 5)°C.

On calcule la densité relative à t°C à partir du chiffre ainsi obtenu en ajoutant à ce chiffre 0.00069 pour chaque degré centigrade dont la température observée excède 20°C ou en soustrayant 0.00069 pour chaque degré centigrade dont la température observée est inférieure à 20°C .

5. DENSITE RELATIVE DE QUELQUES HUILES COMESTIBLES

	Densité relative 20°C/eau 20°C
Huile de colza	0.910 - 0.920
Huile de tournesol	0.918 - 0.923
Huile de carthame	0.922 - 0.927
Huile de soja	0.919 - 0.925
Huile d'arachide	0.914 - 0.917
Huile d'olive (vierge et raffinée)	0.910 - 0.916
Huile de maïs	0.917 - 0.925
Huile de coton	0.918 - 0.926
Huile de sésame	0.915 - 0.925

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 21 Ramadhan 1432 correspondant au 21 août 2011 rendant obligatoire la méthode de détermination de l'indice d'acide et d'acidité des corps gras d'origine animale et végétale.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 10-149 du 14 Joumada Etania 1431 correspondant au 28 mai 2010 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 21 Chaâbane 1419 correspondant au 10 décembre 1998 relatif aux spécifications techniques des beurres et aux modalités de leur mise à la consommation ;

Vu l'arrêté interministériel du 2 Dhou El Hidja 1422 correspondant au 14 février 2002 fixant la liste des additifs autorisés dans les denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de l'indice d'acide et d'acidité des corps gras d'origine animale et végétale.

Art. 2. — Pour la détermination de l'indice d'acide et d'acidité des corps gras d'origine animale et végétale, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 21 Ramadhan 1432 correspondant au 21 août 2011.

Mustapha BENBADA.

— — — —

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE L'INDICE D'ACIDE ET D'ACIDITE DES CORPS GRAS D'0RIGINE ANIMALE ET VEGETALE

1. Domaine d'application

La présente méthode spécifie deux méthodes (titrimétrique et potentiométrique) de détermination des acides gras libres dans les corps gras d'origine animale et végétale.

Les acides sont exprimés, de préférence, par l'indice d'acide ou en alternative, par l'acidité calculée conventionnellement.

La méthode est applicable aux corps gras d'origine animale et végétale. Elle n'est pas applicable aux cires.

2. Définition

Dans le cadre de la présente méthode, les définitions suivantes sont applicables :

2.1 Indice d'acide : Nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires pour neutraliser les acides gras libres présents dans 1 g de corps gras.

2.2 Acidité : Expression conventionnelle du pourcentage d'acides gras libres.

Selon la nature du corps gras, l'acidité peut aussi être exprimée comme indiqué dans le tableau 1.

Si le résultat indique simplement " acidité " sans autre précision, elle est, par convention, exprimée en pourcentage d'acide oléique.

Si l'échantillon contient des acides minéraux, ceux-ci sont, par convention, déterminés comme acides gras.

Tableau 1

NATURE DU CORPS GRAS	EXPRESSION	MASSE MOLAIRE G/MOL.
Huile de coprah, huile de palmiste et huiles similaires	Acide laurique	200
Huile de palme	Acide palmitique	256
Huiles de certaines crucifères	Acide érucique	338
Tous autres corps gras	Acide oléique	282

3. Méthode titrimétrique

3.1 Généralités

Cette méthode convient particulièrement aux corps gras qui ne sont pas fortement colorés.

3.2 Principe

Mise en solution d'une prise d'essai dans un mélange de solvants, puis titrage des acides gras libres présents à l'aide d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium.

3.3 Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue et l'eau utilisée doit être de l'eau distillée.

3.3.1 Oxyde diéthylique/éthanol à 95% (V/V) mélange 1 + 1 (V/V).

Avertissement

L'oxyde diéthylique est très inflammable et peut former des péroxydes explosifs. Il doit être utilisé en prenant des précautions particulières.

Neutraliser exactement, au moment de l'emploi, avec la solution d'hydroxyde de potassium (3.3.2) en présence de 0,3 ml de la solution de phénolphtaléine (3.3.3) pour 100 ml de mélange.

Note 1

S'il n'est pas possible d'utiliser l'oxyde diéthylique, un mélange de solvants formé d'éthanol et de toluène peut être utilisé. Si nécessaire, l'éthanol peut être remplacé par le propanol-2.

3.3.2 Hydroxyde de potassium, solution éthanolique titrée, c(KOH) = 0,1 mol/l, ou, si nécessaire, c(KOH) = 0,5 mol/1.

La concentration exacte de la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium doit être connue et vérifiée immédiatement avant l'emploi. Utiliser la solution préparée au moins cinq (5) jours avant l'emploi et décantée dans un flacon en verre brun fermé avec un bouchon en caoutchouc.

La solution doit être incolore ou jaune paille.

Note 2

Une solution incolore stable d'hydroxyde de potassium peut être préparée de la façon suivante :

Porter et maintenir durant 1 h à l'ébullition à reflux 1000 ml d'éthanol avec 8 g d'hydroxyde de potassium et 0,5 g de rognures d'aluminium. Distiller immédiatement. Dissoudre dans le distillat la quantité requise d'hydroxyde de potassium.

Laisser reposer durant plusieurs jours et décanter le liquide clair surnageant du précipité de carbonate de potassium.

La solution peut aussi être préparée sans distillation de la façon suivante :

A 1000 ml d'éthanol, ajouter 4 ml de butylate d'aluminium et laisser reposer le mélange durant quelques jours.

Décanter le liquide surnageant et y dissoudre la quantité requise d'hydroxyde de potassium. Cette solution est prête pour l'emploi.

3.3.3 Phénolphtaléine, solution à 10 g/l dans l'éthanol 95 à 96% (V/V) ou bleu alcalin (dans le cas de corps gras fortement colorés) solution à 20 g /l dans l'éthanol 95 à 96% (V/V).

3.4 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

3.4.1 Balance analytique.

3.4.2 Fiole conique, de 250 ml de capacité.

3.4.3 Burette, de 10 ml de capacité, graduée en 0,1 ml.

3.5 Echantillonnage

L'échantillonnage se fait dans des conditions appropriées.

3.6 Mode opératoire

3.6.1 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la méthode de préparation de l'échantillon.

3.6.2 Prise d'essai

Prélever une prise d'essai, selon l'indice d'acide présumé, d'aprés les indications du tableau 2.

Tableau 2

INDICE D'ACIDE PRESUME	MASSE DE LA PRISE D'ESSAI g	PRECISION DE LA PRISE D'ESSAI g
<1	20	0.05
1 à 4	10	0.02
4 à 15	2.5	0.01
15 à 75	0.5	0.001
>75	0.1	0.0002

Peser la prise d'essai dans la fiole conique (3.4.2)

3.6.3 Détermination

Dissoudre la prise d'essai (3.6.2) dans 50 à 150 ml du mélange oxyde diéthylique / éthanol (3.3.1) préalablement neutralisé.

Titrer, en agitant avec la solution d'hydroxyde de potassium à 0,1 mol/l (3.3.2) (voir note 3) jusqu'à virage de l'indicateur (coloration rose de la phénolphtaléine persistant durant au moins 10 secondes).

Note 3

1/ Dans le cas d'indices très faibles (< 1), il est préférable de faire passer un léger courant d'azote dans la solution d'essai.

2/ La solution éthanolique titrée d'hydroxyde de potassium (3.3.2) peut être remplacée par une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium ou de sodium lorsque le volume d'eau introduit n'entraîne pas une séparation de phases.

— Si la quantité nécessaire de solution d'hydroxyde de potassium à 0,1 mol/l dépasse 10 ml, utiliser une solution à 0,5 mol/l.

— Si la solution devient trouble pendant le titrage, ajouter une quantité suffisante du mélange de solvants (3.3.1) pour donner une solution claire.

3.6.4 Nombre de déterminations

Effectuer deux déterminations sur le même échantillon pour un essai.

4. Méthode potentiométrique

La présente méthode est d'application générale, mais elle est plus particulièrement destinée aux corps gras bruts de couleur foncée en raison de la difficulté d'application, dans ce cas, de la méthode titrimétrique .

4.1 Principe

Titrage potentiométrique des acides gras libres présents dans une prise d'essai à l'aide d'une solution isopropanolique d'hydroxyde de potassium en milieu non aqueux.

4.2 Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue, et l'eau utilisée doit être de l'eau distillée.

4.2.1 Méthylisobutylcétone, neutralisé au moment de l'emploi avec la solution isopropanolique d'hydroxyde de potassium (4.2.2) en présence de phénophtaléine, jusqu'au virage au rose.

4.2.2 Hydroxyde de potassium, solution titrée, c(KOH) = 0,1 mol/l ou 0,5 mol/l.

4.2.2.1 Hydroxyde de potassium, solution titrée, c(KOH) = 0,1 mol/l dans du propanol 2 :

Dissoudre 7 g d'hydroxyde de potassium en pastilles dans du propanol 2 et compléter à 1000 ml avec du propanol 2.

4.2.2.2 Hydroxyde de potassium, solution titrée c(KOH) = 0,5 mol/l dans du propanol - 2 :

Dissoudre 35 g d'hydroxyde de potassium en pastilles dans du propanol - 2 et compléter à 1000 ml avec du propanol 2.

4.2.2.3. Etalonnage

La concentration exacte de la solution doit être déterminée immédiatement avant emploi.

Peser à 0,0002 g près 0,15 g (pour la solution 4.2.2.1) ou 0,75g (pour la solution 4.2.2.2) d'acide benzoïque de pureté 99,9%, l'introduire dans un bécher (4.3.2) et le dissoudre dans 50 ml de méthylisobutycétone (4.2.1).

Introduire les électrodes du pH-mètre (4.3.4), déclencher l'agitateur (4.3.5) et titrer avec la solution d'hydroxyde de potassium (4.2.2.1 ou 4.2.2.2) jusqu'au point d'équivalence (voir note 5 - 1 en 4.5.3)

La concentration de la solution d'hydroxyde de potassium (4.2.2.1 ou 4.2.2.2) exprimée en moles par litre, est donnée par la formule :

$$\frac{1000 \times m_0}{122{,}1 \times v_0}$$

Où

m_0 est la masse, en grammes, d'acide benzoïque utilisé pour l'étalonnage ;

V_0 est le volume, en millilitres, de la solution d'hydroxyde de potassium (4.2.2.1 ou 4.2.2.2) utilisé.

4.3 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

4.3.1 Balance analytique

4.3.2 Bécher de 150 ml de capacité, forme haute.

4.3.3 Burette de 10 ml de capacité, graduée en 0,1 ml

4.3.4 pH-mètre, équipé d'électrodes en verre et au calomel.

Le contact entre la solution saturée de chlorure de potassium et la solution d'essai doit être effectué à travers une plaque de porcelaine ou de verre fritté d'au moins 3 mm d'épaisseur.

Note 4

Il y a intérêt à conserver durant 12 h avant les titrages l'électrode en verre dans l'eau distillée, ou mieux, dans la méthylisobutylcétone. La sécher très doucement avec un papier filtre avant d'effectuer le mesurage. La rincer immédiatement après le dosage avec de la méthylisobutylcétone, puis avec un propanol 2, enfin avec de l'eau distillée.

Si l'électrode ne fonctionne pas de façon satisfaisante, essayer de la régénérer en la conservant durant 24 h dans une solution isopropanolique d'acide chlorhydrique à 1 mol/l. Après ce traitement, laver l'électrode à l'eau distillée, puis avec du propanol - 2 et de la méthylisobutylcétone.

L'emploi de plaques de porcelaine ou de verre fritté épaisses pour assurer le contact entre la solution saturée de chlorure de potassium et la solution d'essai évite les courants de diffusion et les potentiels parasites.

4.3.5 Agitateur, de préférence agitateur magnétique

4.4 Echantillonnage

L'échantillonnage se fait dans des conditions appropriées.

4.5 Mode opératoire

4.5.1 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la méthode de préparation des échantillons.

4.5.2 Prise d'essai

Dans le bêcher (4.3.2) peser à 0,01 g près, 5 à 10 g de l'échantillon pour essai.

4.5.3 Détermination

Dissoudre la prise d'essai (4.5.2) dans 50 ml de méthylisobutylcétone (4.2.1).

Introduire les électrodes du pH-mètre (4.3.4), déclencher l'agitateur (4.3.5) et titrer avec la solution d'hydroxyde de potassium (4.2.2.1 ou 4.2.2.2) selon l'acidité présumée de l'échantillon, jusqu'au point d'équivalence.

Note 5

1 — Le point d'équivalence est généralement voisin de la valeur 10 lue sur l'échelle des pH et peut être déterminé graphiquement en l'identifiant sur la courbe de neutralisation au point d'inflexion.

Il est également possible de le calculer en prenant la valeur pour laquelle la dérivée première de la variation du pH en fonction de la quantité de la solution d'hydroxyde de potassium ajoutée est maximale, ou la valeur pour laquelle la dérivée seconde s'annule.

2 — Le point d'inflexion n'est pas possible à déterminer dans le cas des huiles de coton brutes.

Dans ce cas, utiliser une détermination conventionnelle du point d'inflexion arbitrairement fixé au pH du point d'équivalence de la neutralisation de l'acide oléique par l'hydroxyde de potassium dans le solvant utilisé pour le titrage, comme décrit ci-après.

Dissoudre environ 0,282 g d'acide oléique dans 50 ml de méthylisobutylcétone (4.2.1). Tracer la courbe de neutralisation de l'acide oléique par la solution d'hydroxyde de potassium (4.2.2) utilisé. Lire sur la courbe le pH du point d'inflexion (correspondant en principe à l'addition de 10 ml de solution d'hydroxyde de potassium à 0,1 mol/l). A partir de cette valeur, lire sur la courbe de neutralisation de l'huile de coton le volume de solution d'hydroxyde de potassium utilisé pour neutraliser l'huile de coton.

4.5.4 Nombre de déterminations

Effectuer deux détermination sur le même échantillon pour essai

5. Expression des résultats

5.1 Expression en indice d'acide

L'indice d'acide est égal à :

$$\frac{56{,}1 \times V \times C}{m}$$

Où :

56,1 : est la masse molaire, exprimée en grammes par mole, de l'hydroxyde de potassium ;

V : est le volume, en millilitres, de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisé ;

C : est la concentration exacte, en moles par litre, de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisée ;

m : est la masse, en grammes, de la prise d'essai.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations.

5.2 Expression en acidité

L'acidité peut être calculée à partir des résultats obtenus pour la détermination de l'indice d'acide, soit par la méthode titrimétrique (3), soit par la méthode potentiométrique (4).

L'acidité exprimée en pourcentage en masse est égale à :

$$V.C \frac{M}{1000} \times \frac{1OO}{m} = \frac{V \times C \times M}{10 \cdot m}$$

Où :

V : est le volume, en millilitres, de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisée ;

C : est la concentration exacte en moles par litre, de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisé ;

M : est la masse molaire, en grammes par mole, de l'acide adopté pour l'expression du résultat (voir tableau 1).

m : est la masse en grammes de la prise d'essai.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations.

— — — —

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 21 Ramadhan 1432 correspondant au 21 août 2011 rendant obligatoire la méthode de détermination de l'indice d'iode des corps gras d'origine animale et végétale.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 10-149 du 14 Joumada Ethania 1431 correspondant au 28 mai 2010 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 21 Chaâbane 1419 correspondant au 10 décembre 1998 relatif aux spécifications techniques des beurres et aux modalités de leur mise à la consommation ;

Vu l'arrêté interministériel du 2 Dhou El Hidja 1422 correspondant au 14 février 2002 fixant la liste des additifs autorisés dans les denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de l'indice d'iode des corps gras d'origine animale et végétale.

Art. 2. — Pour la détermination de l'indice d'iode des corps gras d'origine animale et végétale, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 21 Ramadhan 1432 correspondant au 21 août 2011.

Mustapha BENBADA.

— — — — — — — —

ANNEXE

METHODE DE DETERMINAT1ON DE L'INDICE D'IODE DES CORPS GRAS D'ORIGINE ANIMALE ET VEGETALE

1- DEFINITION

Indice d'iode : Quantité de monochlorure d'iode, exprimée en grammes d'iode, absorbée par 100g du produit dans les conditions opératoires décrites dans la présente méthode.

2- PRINCIPE

Addition à une prise d'essai d'une solution de monochlorure d'iode dans un mélange formé d'acide acétique et de tétrachlorure de carbone. Après un temps donné de réaction, réduction de l'excès de monochlorure d'iode par addition d'une solution d'iodure de potassium et d'eau et titrage de l'iode libéré par une solution titrée de thiosulfate de sodium.

3- REACTIFS

Tous les réactifs utilisés doivent être de qualité analytique.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau de pureté au moins équivalente.

3.1 - Iodure de potassium, solution à 100g/l, exempte d'iode libre ou d'iodate.

3.2 - Empois d'amidon, Mélanger 5g d'amidon, soluble, avec 30ml d'eau, ajouter ce mélange à 1000ml d'eau bouillante et laisser bouillir durant 3 minutes.

3.3- Thiosulfate de sodium, solution titrée 0.1 N.

3.4 - Acide acétique cristallisable, exempt d'éthanol et de matières oxydables.

3.5 - Tétrachlorure de carbone, exempt de matières oxydables.

NOTE 1

Vérifier l'absence de matières oxydables dans chacun des réactifs (3.4) et (3.5), en agitant 10ml du réactif avec 1 ml de solution saturée de bichromate de potassium, et 2 ml d'acide sulfurique concentré, masse volumique à 20° = 1,84g/ml. Aucune coloration verte ne doit apparaître.

3.6 - Monochlorure d'iode, solution dans un mélange acide acétique / tétrachlorure de carbone (réactif de Wijs).

Ce réactif existe dans le commerce, il peut être préparé de la manière suivante :

Dans un flacon en verre brun de 1500 ml, peser 9 g de trichlorure d'iode (lCL3), les dissoudre dans un mélange formé de 700 ml de l'acide acétique cristallisable (3.4) et de 300 ml du tétrachlorure de carbone (3.5).

Prendre 5 ml de la solution et ajouter 5 ml de la solution d'iodure de potassium (3.1) et 30 ml d'eau.

Titrer l'iode libéré avec la solution de thiosulfate de sodium (3.3), en présence de quelques gouttes de l'empois d'amidon (3.2) comme indicateur. Ajouter l0g d'iode pur bisublimé au réactif et les dissoudre complètement par agitation. Titrer l'iode libre comme précédemment.

Cette teneur doit être égale à une fois et demie celle de la première détermination. Dans le cas contraire, ajouter une faible quantité d'iode pur bisublimé jusqu'à ce que la teneur dépasse légèrement la limite d'une fois et demie, car il ne doit subsister aucune trace de trichlorure d'iode, ce dernier provoquant des réactions secondaires.

Laisser décanter la solution, puis verser le liquide limpide dans un flacon jaune ou brun. Si la solution est conservée dans un flacon bien bouché, à l'abri de la lumière, elle peut être utilisée pendant plusieurs mois.

NOTE 2

Si l'on ne dispose pas de trichlorure d'iode, le réactif de Wijs peut être préparé à partir de monochlorure d'iode (ICL), de la manière suivante :

Dissoudre 19 g de monochlorure d'iode dans 700 ml d'acide - acétique cristallisable (3.4) et 300 ml de tétrachlorure de carbone.

Après addition de quelques milligrammes d'iode pur bisublimé, titrer l'iode libre comme décrit précédemment.

Diluer, si nécessaire, avec le mélange de solvant spécifié, jusqu'à ce que 5 ml de réactif correspondent à environ 10 ml de la solution de thiosulfate de sodium (3.3).

La composition correcte du réactif devrait être déterminée selon le mode opératoire suivant :

A) Dans une fiole à col large, d'environ 250 ml, munie d'un bouchon en verre rodé, introduire 50 ml d'une solution d'acide chlorhydrique à 50% (V/V) et 50 ml de tétrachlorure de carbone.

Ajouter exactement 25 ml de réactif de Wijs, préparé à partir de monochlorure d'iode et mélanger.

Titrer l'iode présent dans la couche rouge-violet du tétrachlorure de carbone avec une solution d'iodate de potassium 0,04N, en agitant vigoureusement jusqu'à ce que la couche devienne incolore.

Si la couche de tétrachlorure de carbone est déjà incolore, cela signifie que le réactif de Wijs ne contient pas d'iode libre et donc le rapport de l'iode au chlore est inférieur à 1; dans ce cas, il est nécessaire d'ajouter, aux 25 ml de la solution préparée du réactif de Wijs, une quantité d'iode pur bisublimé permettant de développer la coloration rouge-violet.

Calculer ensuite la quantité d'iode nécessaire pour la totalité du réactif de Wijs et la dissoudre dans cette solution.

Recommencer encore une fois comme décrit précédemment et titrer l'iode présent dans la couche rouge-violet du tétrachlorure de carbone avec une solution d'iodate de potassium 0,04N.

B) Dans une deuxième fiole à col large, d'environ 250 ml, munie d'un bouchon en verre rodé, introduire exactement 25 ml de réactif de wijs renfermant suffisamment d'iode.

Ajouter 15 ml d'une solution d'iodure de potassium à 150 g/l et environ 150 ml d'eau.

Agiter et titrer l'iode libéré au moyen de la solution de thiosulfate de sodium (3.3) comme indicateur, agiter vigoureusement à la fin du titrage.

CALCUL :

$$\frac{Iode}{Chlore} = \frac{V_1 T_1 + V_2 T_2}{V_1 T_1 - V_2 T_2}$$

Où :

V_1 est le volume, en millilitres, de la solution thiosulfate de sodium (3.3), utilisé pour déterminer l'iode du monochlorure d'iode.

V_2 est le volume, en millilitres, de la solution d'iode de potassium 0,04 N, utilisé pour déterminer l'iode libre.

T_1 est la normalité exacte de la solution de thiosulfate de sodium (3.3) utilisée.

T_2 est la normalité exacte de la solution d'iode de potassium utilisée.

Il est à noter que lorsqu'il s'agit de vérifier seulement si le réactif de wijs contient réellement un léger excès d'iode, on peut s'arrêter au titrage décrit en A du mode opératoire.

Au moment où la couche de tétrachlorure de carbone se colore, soit directement après addition de 25ml du réactif de wijs à la solution d'acide chlorhydrique et de tétrachlorure de carbone, soit après avoir dissous une quantité suffisante d'iode pur bisublimé dans le réactif de wijs, il est évident que le rapport à déterminer est plus grand que 1.

4 - APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

4.1 – Nacelles en verre, de capacité appropriée à la prise d'essai.

4.2 – Flacons à col large, munis de bouchons rodés (par exemple, verre à fioles à l'indice d'iode), de capacité environ 250 ml.

4.3 – Burettes, de 50 ml graduées en 0.1 ml.

4.4 - Pipettes, de 20 et 25 ml.

4.5 – Balance analytique.

Note 3

L'appareillage doit être parfaitement propre et sec.

5 – ECHANTILLONNAGE

La préparation de l'échantillon pour essai des corps gras d'origine animale et végétale se fait dans les conditions appropriées.

6 - MODE OPERATOIRE

6.1- Prise d'essai

La masse de la prise d'essai varie de la façon suivante, selon l'indice d'iode présumé :

INDICE D'IODE PRESUME	PRISE D'ESSAI EN GRAMMES
inférieur à 5	3,00
5 à 20	1,00
21 à 50	0,40
51 à 100	0,20
101 à 150	0,13
151 à 200	0,10

Faire fondre l'échantillon, si nécessaire, à une température d'environ 10°C au dessus du point de fusion et filtrer, à cette température, sur un papier filtre sec pour filtration rapide sur lequel on aura placé 4g de sulfate de sodium anhydre et 1 g d'adjuvant de filtration.

Le filtrat doit être parfaitement limpide.

6.2 - Détermination

La détermination doit être effectuée à la température ambiante.

Peser la prise d'essai, à 0.001 g près, dans une nacelle en verre (4.1). L'introduire dans un flacon de 250 ml (4.2).

Ajouter 15 ml du tétrachlorure de carbone (3.5) pour dissoudre la matière grasse. Ajouter exactement 25 ml du réactif de wijs (3.6), boucher, agiter doucement et placer le flacon dans un endroit sombre.

Pour les produits ayant un indice d'iode inférieur à 150, laisser le flacon dans un endroit sombre durant 1 h ; pour ceux ayant un indice d'iode supérieur à 150, et pour des produits polymérisés ou des produits considérablement oxydés, le laisser durant 2h.

Après ce temps, ajouter 20 ml de la solution d'iodure de potassium (3.1) et 150 ml d'eau.

Titrer avec la solution de thiosulfate de sodium (3.3) jusqu'à ce que la couleur jaune due a l'iode ait presque disparu. Ajouter quelques gouttes de l'empois d'amidon (3.2) et poursuivre le titrage jusqu'au moment où la couleur bleu disparaît après avoir agité très vigoureusement.

Note 4

Il est possible d'effectuer un titrage potentiométrique. Effectuer deux déterminations sur le même échantillon pour essai.

6.3- Essai à blanc

Effectuer, en même temps, un essai à blanc dans les mêmes conditions.

7- EXPRESSION DES RESULTATS

7.1- Mode de calcul et formule

L'indice d'iode est égal à :

$$\frac{12{,}69\, T_1\, (V_3 - V_4)}{m}$$

Où :

T_1 est la normalité exacte de la solution de thiosulfate de sodium (3.3) utilisée ;

V_3 est le volume, en millilitres, de la solution de thiosulfate de sodium (3.3), utilisé pour essai à blanc ;

V_4 est le volume, en millilitres, de la solution de thiosulfate de sodium (3.3) utilisé pour la détermination ;

m est la masse, en grammes, de la prise d'essai.

7.2 - Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations, effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre par le même analyste, ne doit pas dépasser 0.4 unité d'indice d'iode.

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DU COMMERCE

DIRECTION GÉNÉRALE DU CONTRÔLE ÉCONOMIQUE ET DE LA RÉPRESSION DES FRAUDES

Direction des Laboratoires d'Essais et d'Analyses de la Qualité

MÉTHODES OFFICIELLES D'ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES RELATIVES AUX CÉRÉALES ET PRODUITS DÉRIVÉS

Sommaire

1. Arrêté du 23 Février 2012 rendant obligatoire une méthode de détermination de la masse de 1000 grains dans les céréales et les légumineuses. (JO n° 01 - 2013)	**01**
2. Arrêté du 06 Février 2012 rendant obligatoire une méthode de détermination de la teneur en eau dans les céréales et produits céréaliers. (JO n° 08 - 2013)	**03**
3. Arrêté du 06 Juin 2012 rendant obligatoire une méthode de l'acidité grasse dans les farines et les semoules de blé. (JO n° 35 - 2013)	**06**
4. Arrêté du 06 Juin 2012 rendant obligatoire une méthode de dosage du taux de cendres par incinération dans les, légumineuses et produits dérivés. (JO n° 35 - 2006)	**08**

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du Aouel Rabie Ethani 1433 correspondant au 23 février 2012 rendant obligatoire la méthode de détermination de la masse de 1000 grains dans les céréales et les légumineuses.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 10-149 du 14 Joumada Etania 1431 correspondant au 28 mai 2010 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02- 453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Arrête :

Article ler. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de la masse de 1000 grains dans les céréales et les légumineuses.

Art. 2. — Pour la détermination de la masse de 1000 grains dans les céréales et les légumineuses, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le Aouel Rabie Ethani 1433 correspondant au 23 février 2012.

Mustapha BENDADA.

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE LA MASSE DE 1000 GRAINS DANS LES CEREALES ET LES LEGUMINEUSES

1. DEFINITION

— masse de 1000 grains tels quels : masse de 1000 grains avec leur teneur en eau existant au moment de la détermination ;

— masse de 1000 grains sur sec : masse de 1000 grains, rectifiée de manière à tenir compte de leur teneur en eau existant au moment de la détermination.

2. PRINCIPE

Pesée d'une quantité de l'échantillon, séparation et pesée des grains entiers. Comptage des grains entiers et par règle de trois, obtention de la masse de 1000 grains.

3. MATERIEL

— **balance** précise à 0,01 g.

— **pince** (pour saisir les grains).

— **compteur de grains** (c'est un appareil approprié pour le comptage des grains par exemple : compteur photoélectrique). A défaut d'appareil approprié, le comptage pourra être manuel.

4. MODE OPERATOIRE

4.1 Nombre de déterminations

— effectuer deux déterminations sur le même échantillon pour laboratoire.

4.2 Détermination de la masse de 1000 grains tels quels

Prélever au hasard une quantité à peu près égale à la masse de 500 grains de l'échantillon tel quel. (Le manipulateur exercé évalue facilement cette quantité).

Dans le cas contraire effectuer quelques essais sur l'échantillon donné.

— Sélectionner les grains entiers et les peser à 0,0 lg près. Compter les grains entiers ensuite à l'aide du compteur de grains ou, à défaut de compteur, faire un comptage manuel. Les grains de céréales habituellement non vêtus doivent être, le cas échéant, débarrassés de leur enveloppe florale.

4.3 Détermination de la masse de 1000 grains sur sec.

Prélever un autre échantillon pour essai du même échantillon pour laboratoire et en déterminer la teneur en eau des grains entiers, exempts d'impuretés selon la méthode propre au produit concerné.

5. EXPRESSION DES RESULTATS

5.1 Mode de calcul et formules

5.1.1 La masse m_H en gammes, de 1000 grains tels quels est donnée par la formule suivante :

$$m_H = \frac{m_o \times 1000}{N}$$

Où :

m_o : est la masse, en grammes, des grains entiers de la quantité prélevée

N : est le nombre de grains entiers trouvés dans la masse m_o

5.1.2 La masse m_s, en grammes, de 1000 grains sur sec est donnée par la formule :

$$ms = \frac{m_H \times (100 - H)}{100}$$

Où :

m_H : est la masse, en grammes de 1000 grains tels quels.

H : est la teneur en eau, exprimée en pourcentage en masse des grains tels quels.

NOTE

La masse sur sec est égale à la masse telle quelle diminuée de la masse d'eau qui y est contenue.

5.2. Résultat

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations si les conditions de répétabilité sont remplies (voir 5.3).

Dans le cas contraire, refaire les essais.

Exprimer le résultat en indiquant la masse de 1000 grains en grammes :

— avec deux chiffres décimaux si la masse est inférieure à 10 g ;

— avec un chiffre décimal, si la masse est égale ou supérieure à l0g, mais ne dépasse pas 100 g ;

— par un nombre entier si la masse est supérieure à 100 g.

5.3 Répétabilité

La différence entre les résultats des deux déterminations (voir 4.1), effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre par le même analyste, ne doit pas dépasser 6 % pour les grains ayant une masse supérieure à 25 g par 1000 grains et 10 % pour les autres grains.

6. NOTES SUR LE MODE OPERATOIRE

6.1 Echantillon contenant des grains décortiqués et non décortiqués.

Lorsque l'échantillon renferme des grains décortiqués et non décortiqués mélangés, compter les deux sortes de grains séparément et les traiter indépendamment.

6.2 Echantillon contenant des grains jumeaux d'avoine.

Séparer les grains jumeaux d'avoine l'un de l'autre et les compter comme deux grains.

ARRETES, DECISIONS ET AVIS

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 13 Rabie El Aouel 1433 correspondant au 6 février 2012 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en eau dans les céréales et produits céréaliers.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° l0-149 du 14 Joumada Ethania 1431 correspondant au 28 mai 2010 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de la teneur en eau dans les céréales et produits céréaliers.

Art. 2. — Pour la détermination de la teneur en eau dans les céréales et produits céréaliers, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agrés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 13 Rabie El Aouel 1433 correspondant au 6 février 2012.

Mustapha BENBADA.

— — — — — — — —

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE LA TENEUR EN EAU DANS LES CEREALES ET PRODUITS CEREALIERS

(Méthode pratique avec ou sans broyage et sans conditionnement)

1. DEFINITION

La teneur en eau est la perte de masse, exprimée en pourcentage, subie par le produit dans les conditions décrites dans la présente méthode.

2. PRINCIPE

Séchage du produit à une température comprise entre 130°C et 133°C, à pression atmosphérique normale, après broyage éventuel du produit.

3. APPAREILLAGE

3.1 Balance analytique

3.2 Broyeur correspondant aux caractéristiques suivantes :

— construit en matériau n'absorbant pas d'humidité ;

— permettant un broyage rapide et uniforme, sans provoquer d'échauffement sensible du produit et en évitant au maximum le contact avec l'air extérieur ;

— pouvant être réglé de manière à obtenir pour les particules des dimensions adéquates.

3.3 Capsule métallique, non attaquable dans les conditions de l'essai (ou à défaut, capsule en verre thermorésistant), munie d'un couvercle suffisamment étanche et de surface utile permettant d'obtenir une répartition homogène et sans tassement de la prise d'essai (par exemple diamètre de 50 mm et hauteur de 30 mm).

3.4 Etuve isotherme, à chauffage électrique, réglée de façon que la température de l'air et des plateaux porte échantillons, au voisinage des prises d'essai, soit comprise entre 130°C et 133°C en régime normal.

L'étuve doit avoir une capacité calorifique, telle que réglée préalablement à une température de 131°C, elle puisse atteindre à nouveau cette température, moins de 45 min (de préférence moins de 30 min) après la mise en place du nombre maximal de prises d'essai pouvant sécher simultanément.

L'efficacité de la ventilation doit être déterminée à l'aide d'une semoule de blé dur, ayant 1 mm de dimension maximale des particules comme matériau d'essai. La ventilation doit être telle, après insertion du nombre maximal de prises d'essai que l'étuve peut recevoir et séchage à une température comprise entre 130°C et 133°C, les résultats après des périodes de chauffage des mêmes prises d'essai durant 2 h, puis durant 1 h supplémentaire, ne présentent pas entre eux d'écart supérieur à 0,15 g d'eau par 100 g d'échantillon.

3.5 Thermomètre à mercure pour le contrôle de la température à l'intérieur de l'étuve.

3.6 Dessiccateur à plaque métallique ou en porcelaine épaisse perforée contenant un agent déshydratant efficace.

3.7 Pince métallique

4. MODE OPERATOIRE

4.1 Nombre de déterminations

Effectuer deux déterminations sur le même échantillon pour laboratoire.

4.2 Préparation des capsules

Avant utilisation, les capsules découvertes et leurs couvercles doivent :

— sécher à l'étuve durant 15 min à 130°C,

— refroidir dans le dessiccateur jusqu'à la température du laboratoire (entre 30 min et 45 min).

4.3 Préparation de l'échantillon pour essai

4.3.1 Produits ne nécessitant pas de broyage

Les produits qui n'ont pas de particules de dimensions supérieures à 1,7 mm, et dont moins de 10 % (m/m) sont supérieures à 1 mm et plus de 50 % (m/m) inférieures à 0,5 mm, n'ont pas besoin d'être broyés avant la détermination.

4.3.2 Produits nécessitant un broyage

Les produits ne correspondant pas aux caractéristiques granulométriques mentionnées en (4.3.1) doivent être broyés.

Pour cela, opérer comme suit :

— régler le broyeur (3.2) de manière à obtenir les caractéristiques granulométriques désirées puis broyer une petite quantité de l'échantillon pour laboratoire et la rejeter ;

— broyer ensuite, rapidement une quantité de l'échantillon de manière à avoir une prise d'essai d'environ 5 g.

4.4 Prise d'essai

4.4.1 Produit ne nécessitant pas de broyage

Peser rapidement, à 1 mg près, une quantité de substance d'environ 5 g dans la capsule (3.3) tarée, couvercle compris à 1 mg près.

4.4.2 Produits nécessitant un broyage

Verser la totalité de la mouture obtenue dans la capsule tarée comme (4.4.1). Adapter rapidement le couvercle et peser à 1 mg près.

REMARQUES

— avant d'effectuer le prélèvement sur l'échantillon de laboratoire il est nécessaire de bien l'homogénéiser ;

— il faut manipuler les capsules à l'aide de la pince (3.7) et non avec les doigts.

4.5 Déshydratation

Introduire la capsule découverte contenant la prise d'essai et son couvercle dans l'étuve (3.4) et les y laisser séjourner pendant 2 heures (90 min dans le cas des farines), temps compté à partir du moment où la température de l'étuve est à nouveau comprise entre 130°C et 133°C.

Le temps d'étuvage écoulé, retirer rapidement la capsule de l'étuve et la placer dans le dessiccateur (3.6) où elle restera jusqu'à atteindre la température du laboratoire (en général entre 30 et 45 min). La peser ensuite à 1 mg près.

REMARQUES

— ne jamais introduire de produits humides dans une étuve contenant des prises d'essai en fin de déshydratation, cela aurait pour conséquence de réhydrater partiellement ces dernières ;

— dans le cas d'essais en série, ne jamais superposer les capsules dans le dessiccateur.

5. EXPRESSION DES RESULTATS

5.1 Mode de calcul et formules

La teneur en eau exprimée en pourcentage en masse du produit telle qu'elle est donnée par la formule ci-après :

$$\frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

où :

$\mathbf{m_0}$ est la masse, en grammes, de la capsule et de son couvercle ;

$\mathbf{m_1}$ est la masse, en grammes, de la capsule, du couvercle et de la prise d'essai avant séchage ;

$\mathbf{m_2}$ est la masse, en grammes, de la capsule, du couvercle et de la prise d'essai après séchage.

5.2 RESULTAT

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des valeurs obtenues des deux déterminations si les conditions de répétabilité (5.3) le permettent. Dans le cas contraire, recommencer les déterminations. Arrondir le résultat à 0.05% près.

5.3 REPETABILITE

La différence entre les résultats des deux déterminations (4.1), effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre par le même analyste, ne doit pas excéder 0.15 g d'eau pour 100 g d'échantillon.

ARRETES, DECISIONS ET AVIS

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 16 Rajab 1433 correspondant au 6 juin 2012 rendant obligatoire la méthode de détermination de l'acidité grasse dans les farines et les semoules de blé.

———

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 10-149 du 14 Joumada Etania 1431 correspondant au 28 mai 2010 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 3 Rajab 1410 correspondant au 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Arrête :

Articles 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de l'acidité grasse dans les farines et les semoules de blé.

Art. 2. — Pour la détermination de l'acidité grasse dans les farines et les semoules de blé, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 16 Rajab 1433 correspondant au 6 juin 2012,

Mustapha BENBADA.

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE L'ACIDITE GRASSE DANS LES FARINES ET LES SEMOULES DE BLE

La présente méthode décrit une technique de détermination de l'acidité grasse dans les farines et les semoules de blé. Cette méthode s'applique également aux pâtes alimentaires.

1. DEFINITION

L'acidité grasse est l'expression conventionnelle des acides, essentiellement des acides gras libres, extraits dans les conditions qui suivront. Elle est exprimée en grammes d'acide sulfurique pour l00g de matière sèche.

2. PRINCIPE

Mise en solution des acides dans l'éthanol à 95 % (v/v) à la température du laboratoire, centrifugation et titrage d'une partie aliquote de la solution surnageante par l'hydroxyde de sodium.

3. REACTIFS

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique et l'eau utilisée doit être de l'eau distillée.

3.1 Ethanol (alcool éthylique) à 95 % (v/v).

3.2 Hydroxyde de sodium (NaOH) : solution titrée à 0,05N dans l'eau distillée dont on aura éliminé le dioxyde de carbone par ébullition. Cette solution doit être exempte de carbonates et doit être conservée dans un flacon en verre inactinique.

Le titre de la solution doit être vérifié immédiatement avant chaque série de détermination de l'acidité.

3.3 Phénolphtaléine solution à 1g pour 100 ml dans l'éthanol à 95% (v/v).

4. APPAREILLAGE

4.1 Balance précise à 0,01g.

4.2 Broyeur permettant un broyage rapide et uniforme, sans provoquer d'échauffement sensible du produit et en évitant au maximum le contact avec l'air extérieur (cas des semoules et des pâtes alimentaires).

4.3 Tamis en toile métallique de 1mm d'ouverture de maille pour les farines et de 160µm et de 500µm d'ouverture de maille pour les semoules et pâtes alimentaires.

4.4 Centrifugeuse à 5000-6000 tours/min.

4.5 Tubes de centrifugeuse de 45 ml en verre ou en plastique neutre bouchés hermétiquement.

4.6 Tubes de 50 ml en verre ou en plastique neutres bouchés hermétiquement.

4.7 Pipettes précises de 10 et 20 ml.

4.8 Fioles coniques ou **erlenmeyers** de 250 ml.

4.9 Micro-burette, graduée en 0,01 ml.

4.10 Agitateur rotatif mécanique, 30-60 tours/min.

5. CONDITIONS DE CONSERVATION

Les échantillons ne doivent pas être conservés à la température du laboratoire plus d'une journée, l'acidité augmente pendant le stockage. Les conserver en flacons étanches à 4°C environ. Avant chaque prélèvement, pour analyse, laisser cet échantillon revenir à la température du laboratoire dans le flacon étanche.

6. MODE OPERATOIRE

6.1 Nombre de déterminations

Faire deux déterminations sur le même échantillon pour essai.

6.2 Préparation de l'échantillon pour essai

6.2.1 Cas des farines : Prélever environ 50 g de farine et les tamiser à l'aide du tamis de 1mm d'ouverture de maille (4.3), de manière à désagréger les agglomérats éventuellement présents.

6.2.2 Cas des semoules et des pâtes alimentaires :

Broyer environ 50 g de produit à l'aide du broyeur (4.2) de telle manière que la totalité du broyat passe au travers du tamis de 500 µm d'ouverture de maille (4.3) et qu'au moins 80 % passent au travers du tamis de 160 µm d'ouverture de maille (4.3).

6.3 Détermination de la teneur en eau

Effectuer immédiatement la détermination de la teneur en eau selon la méthode de détermination de la teneur en eau dans les céréales et produits céréaliers.

6.4 Prise d'essai

Peser à 0,01g près environ 5g de l'échantillon pour essai, après l'avoir bien homogénéisé.

6.5 Détermination

6.5.1 Extraction

- Introduire la prise d'essai dans le tube de centrifugeuse.

- y ajouter à la pipette 30 ml d'éthanol (3.1) et fermer le tube hermétiquement.

- Agiter pendant une heure à l'aide de l'agitateur rotatif mécanique (4.10) en opérant à une température de 20°C ± 5°C. Centrifuger ensuite à deux reprises et successivement pendant 2 min.

Ces deux centrifugations sont plus efficaces qu'une seule de plus longue durée car elles permettent d'éliminer les particules restant en suspension.

NOTE

Si les tubes de centrifugeuse préconisée par cette méthode ne s'adaptent pas à l'agitateur rotatif mécanique (4.10), il y a lieu d'utiliser les tubes de 50 ml (4.6) pour l'extraction et d'effectuer ensuite un transvasement pour la centrifugation.

6.5.2 Titrage

— Prélever à la pipette 20 ml du liquide surnageant parfaitement limpide et les verser dans une fiole conique (4.8) ;

— Ajouter 5 gouttes de phénolphtaléine (3.3) ;

— Titrer à l'aide de la micro-burette (4.9) avec la solution d'hydroxyde de sodium 0,05 N (3.2), jusqu'au virage au rose pâle persistant quelques secondes.

6.6 Essai à blanc

Titrer l'acidité apportée par l'alcool (3.1), en opérant sur 20ml d'éthanol suivant les conditions (6.5 .2).

7. EXPRESSION DES RESULTATS

7.1 Mode de calcul et formules

7.1.1 Acidité exprimée en grammes d'acide sulfurique pour 100 g de matière telle quelle :

$$\frac{7{,}35 \text{ X } (v_1 - v_0) \text{ x T}}{m}$$

7.1.2 Acidité exprimée en gramme d'acide sulfurique pour 100g de matière sèche :

$$\frac{7{,}35 \text{ X } (v_1 - v_0) \text{ x T}}{m - H}$$

où :

V_1 : est le volume, en millilitres, de la solution d'hydroxyde de sodium utilisée pour la détermination ;

V_0 : est le volume, en millilitres, de la solution d'hydroxyde de sodium utilisée pour l'essai à blanc ;

m : est la masse, en grammes, de la prise d'essai ;

T : est le titre exact de la solution d'hydroxyde de sodium utilisée ;

H : est la teneur en eau, en pourcentage en masse, de l'échantillon pour essai.

7.2 Résultat

Faire le calcul avec 4 décimales.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations si les conditions de répétabilité (voir 7.3) sont remplies. Dans le cas contraire, refaire l'essai en double.

Exprimer le résultat à 0,001 % (m/m) près.

7.3 Répétabilité

La différence entre les résultats des deux déterminations (voir 6.1) effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre par le même analyste ne doit pas dépasser 0,002 g d'acide sulfurique pour 100 g de matière sèche.

————★————

Arrêté du 16 Rajab 1433 correspondant au 6 juin 2012 rendant obligatoire la méthode de dosage du taux de cendres par incinération dans les céréales, légumineuses et produits dérivés.

————

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 10-149 du 14 Joumada Etania 1431 correspondant au 28 mai 2010 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de dosage du taux de cendres par incinération dans les céréales, légumineuses et produits dérivés.

Art. 2. — Pour le dosage du taux de cendres par incinération dans les céréales, légumineuses et produits dérivés, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté ;

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 16 Rajab 1433 correspondant au 6 juin 2012.

Mustapha BEN BADA

————————

ANNEXE

METHODE DE DOSAGE DU TAUX DE CENDRES PAR INCINERATION DANS LES CEREALES, LEGUMINEUSES ET PRODUITS DERIVES.

La présente méthode spécifie une technique de dosage des cendres dans les céréales, les légumineuses et leurs produits de mouture destinés à l'alimentation humaine.

Les matériaux et produits sources sont :

a) les graines de céréales ;

b) les farines et les semoules ;

c) les produits de mouture (sons et produits à forte teneur en son, remoulages) ;

d) les farines de céréales composées ;

e) les produits dérivés des céréales autres que les produits de mouture ;

f) les légumineuses et leurs produits dérivés.

La présente méthode n'est applicable ni aux amidons et produits dérivés des amidons, ni aux produits destinés à l'alimentation animale, ni aux semences.

1. Définition

Pour les besoins de la présente méthode la définition suivante s'applique :

Cendres : résidu incombustible obtenu après incinération selon la technique décrite dans la présente méthode.

2. Principe

Incinération d'une prise d'essai jusqu'à combustion complète des matières organiques puis pesée du résidu obtenu. Le résidu obtenu est floconneux après incinération à 550 °C et vitrifié après incinération à 900 °C. De façon générale, les produits contenant des sels (chlorure de sodium, pyrophosphate par exemple) doivent être incinérés à (550 ± 10) °C.

Le Tableau ci-après résume les températures d'incinération à utiliser en fonction des produits.

Températures d'incinération et type de produits.

Type de produits	Températures d'incinération	
Farines	(550 ± 10) °C	(900 ± 25) °C
Semoules	(550 ± 10) °C	(900 ± 25) °C
Graines de céréales	(550 ± 10) °C	(900 ± 25) °C
Autres produits de mouture (par exemple sons, produits à forte teneur en sons, remoulages)	(550 ± 10) °C	—
Préparations composées à base de céréales	(550 ± 10) °C	—
Produits dérivés des céréales autres que les produits de mouture	(550 ± 10) °C	—
Légumineuses et leurs produits dérivés	(550 ± 10) °C	—

3. Réactifs

Sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou de l'eau déminéralisée ou de pureté équivalente.

3.1 Acide chlorhydrique, solution aqueuse, mélange à part égale d'HCI (fraction volumique 35 %) et d'eau.

3.2 Pentoxyde de diphosphore, purifié (P_4O_{10}).

3.3 Éthanol.

4. Appareillage

4.1 Broyeur, facile à nettoyer et ayant un espace mort aussi réduit que possible et apte à assurer un broyage rapide et uniforme.

4.2 Capsule à incinération, de capacité au moins égale à 20 ml, de forme rectangulaire ou circulaire, à fond plat et ayant une surface utile au moins égale à 12 cm^2. Des matériaux appropriés inaltérables dans les conditions de température de l'essai sont les suivants :

a - à 900 °C - platine ou rhodium ;

b - à 550 °C - quartz ou silice ;

Dans les deux cas, le matériau utilisé doit permettre de respecter les valeurs de fidélité.

Les capsules doivent être nettoyées par immersion complète pendant au moins 1 h dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (3.1) puis rincée à l'eau courante et ensuite à l'eau distillée.

Après rinçage, les nacelles en quartz ou en silice doivent être séchées dans une étuve (4.7) pendant le temps nécessaire à l'élimination de l'eau.

4.3 Four à moufle électrique, avec circulation d'air adéquate, comportant un système de réglage de la température et une enceinte réfractaire non susceptible de perdre des particules à la température d'incinération, et pouvant être réglé à (900 ± 25) °C ou à (550 ± 10) °C.

4.4 Dessiccateur à robinet, muni d'une plaque perforée en aluminium ou en porcelaine, et garni de pentoxyde de diphosphore (3.2) comme déshydratant.

4.5 Balance analytique, avec une précision de 0,01 mg.

4.6 Diviseur à rifles ou conique.

4.7 Etuve, pour le séchage des capsules à incinération.

5. Échantillonnage

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

6. Préparation de l'échantillon pour essai

Pour les graines ou les produits contenant des graines entières, homogénéiser et diviser l'échantillon pour obtenir une quantité représentative et compatible avec le type de broyeur (4.1) utilisé. Broyer l'échantillon ainsi obtenu. Les autres produits ne nécessitent pas de broyage.

7. Mode opératoire

7.1 Détermination de la teneur en eau

Procéder préalablement à la détermination de la teneur en eau de l'échantillon pour essai pour les céréales autres que le maïs ou les légumineuses. Il est recommandé de traiter les légumineuses et leurs dérivées avec un temps de séchage de 90 min et un préconditionnement si la fraction massique de l'eau est inférieure à 7 % ou supérieure à 13 %.

7.2 Préparation des capsules à incinération

Pour les capsules à incinération convenant pour l'essai à 900 °C, (4.2), les porter préalablement nettoyées à la température d'incinération utilisée en les plaçant dans le four à moufle (4.3) pendant 5 min, les laisser refroidir dans le dessiccateur (4.4) puis les peser (4.5) à 0,1 mg près.

Pour les capsules à incinération convenant pour l'essai à 550 °C, les nettoyer et les placer dans une étuve (4.7) durant le temps nécessaire au séchage (par exemple 90 min à 130 °C). Immédiatement avant emploi, sortir les capsules de l'étuve et les laisser refroidir dans un dessiccateur (4.4) puis les peser (4.5) à 0,1 mg près.

7.3 Préparation de la prise d'essai

À partir de l'échantillon pour essai préparé selon (6) et soigneusement homogénéisé, peser (4.5) rapidement à 0,1 mg près une prise d'essai comprise entre 3,9 g et 4,1 g dans le cas d'une incinération à 900 °C et entre 4,9 g et 5,1 g dans le cas d'une incinération à 550 °C. Dans le cas des produits à faible densité, la prise d'essai peut être comprise entre (2 ± 0,1) g et (3 ± 0,1) g. Dans la capsule à incinération préparée et tarée comme décrit en (7.2), répartir le produit, sans le tasser, en une couche uniforme.

7.4 Préincinération

Placer la capsule et son contenu à l'entrée du four porté à la température d'incinération. A 900 °C, les produits s'enflamment spontanément. A 550 °C, Il est nécessaire d'ajouter de l'éthanol (3.3) pour les enflammer. Pour une préincinération à 550 °C, il est permis d'introduire les nacelles dans le four froid et de laisser le four monter en température.

7.5 Incinération

Attendre que le produit ait fini de brûler puis introduire la capsule à l'intérieur du four. Fermer la porte du four. Poursuivre l'incinération jusqu'à combustion complète du produit, y compris des particules charbonneuses contenues dans le résidu, soit 1 h après la remontée du four à 900 °C, et 4 h minimum à 550 °C.

Une fois l'incinération terminée, retirer la capsule du four, et la mettre à refroidir dans le dessiccateur (4.4). Pour maintenir l'efficacité du dessiccateur, ne pas superposer les capsules. Dès que la capsule a atteint la température ambiante (soit 15 min à 20 min pour les capsules en platine et 60 min à 90 min minimum pour les capsules en quartz ou en silice), peser à 0,1 mg près et rapidement en raison du caractère hygroscopique des cendres.

Dans le cas de l'incinération à 550°C, des précautions particulières doivent être prises à l'entrée d'air et lors de l'ouverture du dessiccateur pour ne pas entraîner les résidus floconneux.

7.6 Nombre de déterminations

Effectuer au moins deux déterminations sur le même échantillon pour essai.

8. Expression des résultats

Le taux de cendre, en fraction massique par rapport à la matière sèche exprimé en pourcentage, est donné par l'équation (1) :

$$w_{a,d} = (m_2 - m_1) \times \frac{100}{m_0} \times \frac{100}{100 - w_m} \qquad (1)$$

Où :

m_0 : est la masse, en grammes, de la prise d'essai (7.3) ;

m_1 : est la masse, en grammes, de la capsule d'incinération (7.2) ;

m_2 : est la masse, en grammes, de la capsule d'incinération (7.2) et du résidu d'incinération (7.5) ;

w_m : est la teneur en eau, en pourcentage par masse, de l'échantillon (7.1) ;

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations si les conditions de répétabilité (9) sont remplies.

Exprimer le résultat à 0,01 % (par masse) près.

Si besoin est, le taux de cendre, en fraction massique par rapport à la matière humide exprimé en pourcentage, $w_{a,w}$ est donné par l'équation (2) :

$$w_{a,w} = (m_2 - m_1) \times \frac{100}{m_0} \qquad (2)$$

9. Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même appareillage et dans un court intervalle de temps, ne dépassera pas plus de 5 % des cas.

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DU COMMERCE

DIRECTION GÉNÉRALE DU CONTRÔLE ÉCONOMIQUE ET DE LA RÉPRESSION DES FRAUDES

Direction des Laboratoires d'Essais et d'Analyses de la Qualité

MÉTHODES OFFICIELLES D'ANALYSES MICROBIOLOGIQUES RELATIVES AUX EAUX MINÉRALES ET AUX EAUX DE SOURCE

Sommaire

1. Arrêté du 24 juin 2012 rendant obligatoire la méthode de dénombrement des micro-organismes revivifiables dans l'eau. (JO n° 21 - 2013)	**01**
2. Arrêté du 31 décembre 2012 rendant obligatoire la méthode de recherche et de dénombrement des organismes coliformes, organismes coliformes thermotolérants et des escherichia coli présumés dans l'eau. (JO n° 31 - 2013)	**05**
3. Arrêté du 13 juin 2012 rendant obligatoire la méthode de recherche et de dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-éductrices (Clostridia). (JO n° 36 - 2013)	**12**
4. Arrêté du 5 décembre 2012 rendant obligatoire la méthode de détection et de dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'eau par filtration sur membrane. (JO n° 51 - 2013)	**15**

ARRETES, DECISIONS ET AVIS

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 4 Chaâbane 1433 correspondant au 24 juin 2012 rendant obligatoire la méthode de dénombrement des micro-organismes revivifiables dans l'eau.

———

Le ministre du commerce,

Vu la loi n° 05-12 du 28 Joumada Ethania 1426 correspondant au 4 août 2005, modifiée et complétée, relative à l'eau ;

Vu le décret présidentiel n° 10-149 du 14 Joumada Ethania 1431 correspondant au 28 mai 2010 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 22 Dhou El Hidja 1426 correspondant au 22 janvier 2006, modifié et complété, fixant les proportions d'éléments contenus dans les eaux minérales naturelles et les eaux de source ainsi que les conditions de leur traitement ou les adjonctions autorisées ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de dénombrement des micro-organismes revivifiables dans l'eau.

Art. 2. — Pour le dénombrement des micro-organismes revivifiables dans l'eau, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet, doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 4 Chaâbane 1433 correspondant au 24 juin 2012.

Mustapha BENBADA.

ANNEXE

METHODE DE DENOMBREMENT DES MICRO-ORGANISMES REVIVIFIABLES DANS L'EAU

La présente méthode spécifie une technique de dénombrement des micro-organismes revivifiables présents dans l'eau par comptage des colonies se formant dans un milieu de culture nutritif gélosé après incubation en aérobiose à 36 °C et 22 °C.

La méthode vise à mesurer l'efficacité de fonctionnement du procédé de traitement des alimentations publiques en eau potable et, plus généralement de tous les types d'eau. Elle est plus particulièrement applicable à l'analyse des eaux destinées à la consommation humaine, y compris des eaux en récipients fermés et des eaux minérales naturelles.

1. DÉFINITION

Pour les besoins de la présente méthode, la définition suivante s'applique :

Micro-organismes revivifiables : Toute bactérie, aérobie, levure ou moisissure, capable de former des colonies dans le milieu spécifié et dans les conditions d'essai décrites ci-dessous.

2. PRINCIPE

Ensemencement, par mélange dans un milieu de culture spécifié coulé dans des boîtes de pétri, de volumes mesurés d'un échantillon ou de ses dilutions. Incubation d'un jeu de boîtes à 36 °C pendant 44 h et d'un autre jeu à 22 °C pendant 68 h.

Calcul du nombre d'unités formant des colonies par millilitre (UFC/ml) d'échantillon à partir du nombre de colonies formées dans le milieu.

3. APPAREILLAGE ET VERRERIE

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et notamment :

3.1 Appareillage pour la stérilisation en chaleur humide (autoclave) ;

3.2 Étuve capable de maintenir une température de (36 ± 2) °C ;

3.3 Étuve capable de maintenir une température de (22 ± 2) °C ;

3.4 Boîtes de pétri en verre ou en matière plastique de diamètre 90 mm ou 100 mm ;

3.5 Bain d'eau ou équipement similaire, capable de maintenir une température de (45± 1) °C ;

3.6 Appareil pour le comptage des colonies muni d'un système d'éclairage sur fond noir.

4. ÉCHANTILLONNAGE

Prélever les échantillons d'eau conformément aux instructions d'échantillonnage, de manipulation et de conservation.

Analyser l'eau fournie en récipients fermés, y compris les eaux minérales naturelles, dans les 12 h suivant l'embouteillage, et les maintenir à une température de (5 ± 3) °C durant cette période.

5. MILIEUX DE CULTURE ET DILUANTS

5.1 Composants de base

Pour la préparation du milieu, utiliser des composants de qualité uniforme et des produits chimiques de qualité analytique, ou bien utiliser un milieu de culture équivalent complet déshydraté et suivre les instructions du fabricant.

Pour préparer le milieu, utiliser de l'eau distillée dans un appareil en verre et exempte de substances pouvant inhiber la croissance dans les conditions de l'essai.

Note : L'utilisation de produits chimiques d'autres qualités est permise, sous réserve de démontrer qu'ils ont une performance égale pour l'essai.

5.2 Diluant

Pour les dilutions, utiliser le diluant à base de peptone indiqué dans la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture, lignes directrices générales.

5.3 Gélose à l'extrait de levure

Tryptone (Peptone de caséine, pancr.)..... 6,0 g

Extrait de levure déshydraté..... 3,0 g

Gélose en poudre ou en paillettes..... 10 g à 20 g

(en fonction du pouvoir gélifiant)

Eau ..... 1000 ml

Ajouter les composants ou le milieu complet déshydraté, à l'eau et dissoudre par chauffage.Ajuster le pH, si nécessaire, de façon qu'après stérilisation il soit de 7,2 ± 0,2 à 25 °C.

Répartir le milieu par volumes de 15 ml à 20 ml dans des tubes, flacons ou autres récipients. Pour conserver des volumes plus importants, utiliser des récipients de capacité allant jusqu'à 500 ml. Stériliser à l'autoclave (3.1) à (121 ± 3) °C pendant (15 ± 1) min.

Pour l'emploi, faire fondre le milieu, le laisser refroidir et le maintenir à (45 ± 1) °C au moyen du bain d'eau (3.5). Il est recommandé de ne pas garder le milieu plus de 4 h à 45 °C, après quoi le milieu doit être rejeté.

6. MODE OPÉRATOIRE

6.1 Préparation et ensemencement

Préparer l'échantillon, procéder aux dilutions et ensemencer les milieux de cultures selon la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture, lignes directrices générales.

Utiliser la méthode par incorporation (la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture, lignes directrices générales).

Placer un volume de la prise d'essai (ou de ses dilutions) n'excédant pas 2 ml dans la boîte de pétri, ajouter 15 ml à 20 ml de milieu fondu (5.3) et mélanger avec précaution par rotation lente.

Laisser le milieu se solidifier. Le temps entre l'addition de la prise d'essai (ou ses dilutions) et l'addition du milieu fondu ne doit pas excéder 15 min. Ensemencer au moins une boîte par température d'incubation.

6.2 Incubation et examen

Retourner les boîtes et incuber un jeu à (36 ± 2) °C pendant (44 ± 4) h. Incuber l'autre jeu à (22 ± 2) °C pendant (68 ± 4) h. Examiner les boîtes aussitôt qu'elles sont retirées des étuves. Si cela n'est pas possible, les conserver à (5 ± 3) °C et les examiner dans les 48 h. Rejeter toute boîte présentant une croissance confluente.

6.3 Comptage des colonies

Pour chaque température d'incubation, et selon les procédures décrites dans la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture, lignes directrices générales, compter les colonies présentes dans chaque boîte et calculer le nombre estimé d'unités formant les colonies présentes dans 1 ml d'échantillon.

7. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Exprimer les résultats sous la forme du nombre d'unités formant des colonies par millilitre (UFC/ml) d'échantillon pour chaque température d'incubation.

En l'absence de colonie dans les boîtes ensemencées avec les volumes d'essai de l'échantillon non dilué, exprimer le résultat comme étant non détecté dans un millilitre. Si les boîtes ensemencées avec les plus fortes dilutions utilisées contiennent plus de 300 colonies, exprimer les résultats sous la forme > 300 ou uniquement en tant que valeurs approximatives.

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 18 Safar 1434 correspondant au 31 décembre 2012 rendant obligatoire la méthode de recherche et de dénombrement des organismes coliformes, organismes coliformes thermotolérants et des *escherichia coli* présumés dans l'eau.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu la loi n° 05-12 du 28 Joumada Ethania 1426 correspondant au 4 août 2005, modifiée et complétée, relative à l'eau ;

Vu le décret présidentiel n° 12-326 du 17 Chaoual 1433 correspondant au 4 septembre 2012 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 22 Dhou El Hidja 1426 correspondant au 22 janvier 2006, modifié et complété, fixant les proportions d'éléments contenus dans les eaux minérales naturelles et les eaux de source ainsi que les conditions de leur traitement ou les adjonctions autorisées ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de recherche et de dénombrement des organismes coliformes, organismes coliformes thermotolérants et des *escherichia coli* présumés dans l'eau.

Art. 2. — Pour la recherche et le dénombrement des organismes coliformes, organismes coliformes thermotolérants et des *escherichia coli* présumés dans l'eau, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 18 Safar 1434 correspondant au 31 décembre 2012.

Mustapha BENBADA.

— — — — — — — —

ANNEXE

METHODE DE RECHERCHE ET DE DENOMBREMENT DES ORGANISMES COLIFORMES, ORGANISMES COLIFORMES THERMOTOLERANTS ET DES *ESCHERICHIA COLI* PRESUMES.

(Méthode du nombre le plus probable)

La présente méthode prescrit une technique de recherche et de dénombrement des organismes coliformes, des organismes coliformes thermotolérants et des *escherichia coli* présumés par culture dans un milieu liquide dans des tubes multiples et calcul de leur nombre le plus probable dans l'échantillon.

Cette méthode peut être appliquée à tous les types d'eau, même ceux contenant une quantité appréciable de particules en suspension.

Le choix des essais utilisés pour la recherche et la confirmation des organismes du groupe coliforme, y compris *escherichia coli*, peut être considéré comme faisant partie d'une séquence continue. L'importance de la confirmation pour un échantillon donné dépend en partie, de la nature de l'eau et en partiel des raisons ayant conduit à cet examen. Dans la pratique, la recherche d'*escherichia coli* présumés dans l'eau comme indiqué en (1.3) fournit généralement une indication sur la pollution fécale récente.

1. DÉFINITIONS

Pour les besoins de la présente méthode, les définitions suivantes s'appliquent.

1.1 Organismes coliformes :

Organismes capables de former des colonies en aérobiose à 35 °C ± 0,5 °C ou à 37 °C ± 0,5 °C sur un milieu lactosé sélectif et différentiel, avec production d'acide (et d'aldéhyde) dans les 24 h.

1.2 Organismes coliformes thermotolérants :

Organismes coliformes répondant à la définition donnée en (1.1), présentant les mêmes propriétés de fermentation dans les 24 h, à 44 °C ± 0,25 °C ou à 44,5 °C ± 0,25 °C.

1.3 *Escherichia coli* présumés :

Organismes coliformes thermotolérants répondant à la définition donnée en (1.1) qui produisent, en plus, du gaz à partir du lactose (et du mannitol) ainsi que de l'indole à partir du tryptophane dans les 24 h, soit à 44 °C ± 0,25 °C, soit à 44,5 °C ± 0,25 °C.

2. PRINCIPE

Ensemencement d'une série de tubes à essai contenant un milieu de culture sélectif lactosé avec des prises d'essai de l'échantillon dilué ou non.

Examen des tubes à essai après une incubation de 24 h et de 48 h à 35 °C ou 37 °C ; repiquage à partir de chaque tube à essai montrant une turbidité avec une production de gaz dans un milieu de confirmation plus sélectif et, si l'on recherche les *escherichia coli* présumés, sur un milieu sur lequel peut être prouvée la formation d'indole.

Incubation de ces milieux de confirmation pendant 48 h au plus à 35 °C ou à 37 °C pour la recherche d'organismes coliformes, et à 44 °C pendant 24 h au plus pour les organismes coliformes thermotolérants et les *escherichia coli* présumés.

Au moyen de tables statistiques, calcul du nombre le plus probable (NPP) d'organismes coliformes, d'organismes coliformes thermotolérants et de *escherichia coli* présumés, susceptibles d'être présents dans 100 ml de l'échantillon, à partir du nombre de tubes donnant des résultats de confirmation positifs.

3. DILUANTS, MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS

3.1 Produits de base

Pour la préparation des milieux de culture et des réactifs, utiliser des ingrédients de qualité homogène et des produits chimiques de qualité analytique ; suivre les instructions données dans "le tableau B" (Pour des informations sur la conservation, voir la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture). Il est possible également d'utiliser des milieux complets déshydratés, suivre alors à la lettre les instructions les concernant.

Pour la préparation des milieux, utiliser de l'eau distillée ou de l'eau désionisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance bactérienne dans les conditions de l'essai.

3.2 Diluant

Pour préparer les dilutions de l'échantillon, utiliser l'un des diluants recommandés dans le "tableau "B." Préparer le diluant conformément aux instructions données dans" le tableau «B».

3.3 Milieux d'isolement

Utiliser un ou plusieurs des milieux de culture suivants :

Les instructions pour la préparation sont données dans "le tableau B".

3.3.1 Bouillon lactosé

3.3.2 Bouillon de Mac Conkey

3.3.3 Milieu lactosé amélioré au glutamate et au formiate

3.3.4 Bouillon au lauryltryptose (lactose)

3.4 Milieux de confirmation

Utiliser un ou plusieurs des milieux suivants :

3.4.1 Milieux pour la production de gaz

3.4.1.1 Bouillon (bilié) lactosé au vert-brillant

3.4.1.2 Milieu (EC)

3.4.2 Milieu pour la production d'indole (Eau tryptonée.)

3.4.3 Milieu pour tube à essai unique pour production de gaz et d'indole

Bouillon tryptosé au mannitol, au laurylsulfate et au tryptophane.

3.5 Réactifs

3.5.1 Réactif de Kovacs pour la recherche de l'indole

3.5.2 Réactif à l'oxydase pour la recherche de l'oxydase

4. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire microbiologique, y compris :

4.1 Four à air chaud pour stérilisation en chaleur sèche et autoclave

Outre l'appareillage livré stérile, la verrerie et tout autre matériel doivent être stérilisés conformément aux instructions données dans la méthode de dénombrement des microorganismes sur milieu de culture.

4.2 Incubateur ou bain d'eau, réglable à 35 °C ± 0,5 °C ou à 37 °C ± 0,5 °C.

4.3 Incubateur ou bain d'eau, réglable à 44 °C ± 0,25 °C ou à 44,5 °C ± 0,25 °C.

4.4 pH-mètre.

5. ÉCHANTILLONNAGE

Prélever les échantillons et les transmettre au laboratoire conformément à la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture.

6. MODE OPÉRATOIRE

6.1 Préparation de l'échantillon et ensemencement des milieux

Pour la préparation de l'échantillon et des dilutions et l'ensemencement des milieux d'isolement avec les prises d'essai, suivre les instructions données dans la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture. Ensemencer des tubes à essai contenant un milieu d'isolement double concentration avec des prises d'essai de 5 ml ou plus.

6.2 Incubation des tubes

Faire incuber les tubes ensemencés à 35 °C ± 0,5 °C ou à 37 °C ± 0,5 °C pendant 48 h.

6.3 Examen des tubes à essai

Examiner les cultures en tubes à essai après incubation pendant 18 h à 24 h et considérer comme réactions positives, les tubes présentant une turbidité due à une croissance bactérienne et à la formation de gaz dans les cloches de Durham, ainsi qu'une production d'acide si le milieu d'isolement contient un indicateur de pH. Faire incuber à nouveau les tubes à essai qui ne présentent aucun de ces changements et les examiner à nouveau après 48 h pour rechercher une réaction positive.

6.4 Essais de confirmation

Il convient de noter que les réactions positives dans les tubes à essai contenant un milieu d'isolement n'indiquent que la présence d'organismes coliformes présumés. Il est donc important de procéder à des essais de confirmation.

6.4.1 Repiquage, incubation et examen

Faire un repiquage à partir de chaque tube de milieu d'isolement présentant un résultat positif dans un ou plusieurs tubes contenant des milieux de confirmation (3.4) pour la production de gaz et d'indole.

Note 1 : Si on utilise le bouillon lactosé le moins inhibiteur pour l'isolement, il est recommandé de repiquer sur l'un des deux milieux de confirmation les plus sélectifs [bouillon (bilié) lactosé au vert-brillant ou bouillon EC] pour confirmation.

6.4.1.1 Organismes coliformes

Pour confirmer la présence d'organismes coliformes, faire incuber un tube à essai de bouillon (bilié) lactosé au vert-brillant (3.4,1.1) à 35 °C ou à 37 °C et rechercher la production de gaz dans les 48 h.

6.4.1.2 Organismes coliformes thermotolérants et *escherichia coli* présumés

Pour confirmer la présence d'organismes coliformes thermotolérants, faire incuber un autre tube à essai de milieu EC (3.4.1.2) à 44 °C pendant 24 h et rechercher la production de gaz.

Pour confirmer la présence d'*escherichia coli* présumés, faire incuber un tube à essai d'eau tryptonée (3.4.2) pour la recherche d'indole à 44 °C pendant 24 h. Puis ajouter 0,2 ml à 0,3 ml de réactif de Kovacs (3.5.1) dans le tube contenant de l'eau tryptonée : l'apparition d'une coloration rouge après l'avoir mélangé avec précaution indique la présence d'indole.

Note 2 : L'utilisation d'un bouillon tryptosé au mannitol, au laurylsulfate et au tryptophane permet de montrer la production de gaz et d'indole par les *escherichia coli.*

Note 3 : La détection d'*escherichia coli* présumés est considérée comme une preuve suffisante de pollution fécale. Toutefois, des essais complémentaires des *escherichia coli* peuvent être effectués, si nécessaire (6.5).

Note 4 : Lorsqu'on procède à des repiquages de colonies sur membranes dans des tubes de milieux de confirmation, il est préférable de repiquer également sur boîte de milieu nutritif gélosé pour l'essai à l'oxydase.

6.5 Essai à l'oxydase

Certaines bactéries présentes dans l'eau peuvent, à de nombreux égards, être conformes à la définition des organismes coliformes, mais elles ne peuvent produire de gaz à partir du lactose qu'à des températures inférieures à 37 °C. Elles donnent donc des résultats négatifs lors des essais de confirmation normalisés pour les organismes coliformes et leur présence dans l'eau n'est donc pas considérée comme significative. Parce que les espèces d'aéromones qui se présentent naturellement dans l'eau interfèrent seulement à une température de 37 °C et en dessous, il est seulement nécessaire d'effectuer l'essai à l'oxydase en déterminant des coliformes.

6.5.1 Effectuer l'essai à l'oxydase avec des cultures pures d'organismes en faisant fermenter le lactose, cultivés sur un milieu nutritif à la gélose, comme suit :

— placer 2 ou 3 gouttes de réactif à l'oxydase nouvellement préparé (3.5.2) sur un papier filtre dans une boite de pétri ;

— avec une tige de verre, un coton-tige ou une boucle en platine (non en nickel-chrome), étaler une partie de la culture sur le papier filtre préparé (voir note 4) ;

— considérer l'apparition d'une coloration bleu violet foncé dans les 10 s comme une réaction positive.

Note 5 : Chaque fois qu'est employé le réactif à l'oxydase, effectuer des essais de contrôle avec des cultures d'organismes connues pour donner une réaction positive (Pseudomonas aeruginosa) ainsi qu'avec une culture donnant une réaction négative (*escherichia coli*).

7. EXPRESSION DES RÉSULTATS

A partir du nombre de tubes de milieu d'isolement ayant donné des réactions positives aux essais confirmatifs, calculer, par référence aux tables statistiques de la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture, le nombre le plus probable d'organismes coliformes, d'organismes coliformes thermotolérants et d'*escherichia coli* présumés présents dans 100 ml d'échantillon.

Tableau A

Informations microbiologiques complémentaires liées à l'examen de l'eau et à la recherche d'organismes du groupe coliforme

Pour l'examen de routine de l'eau, le groupe coliforme peut être décrit généralement en termes microbiologiques quoique non taxonomiques comme suit :

les organismes coliformes sont des bactéries en forme de bâtonnets, Gram négatif, ne formant pas de spores, présentant une réaction négative à l'oxydase, pouvant croître en aérobiose, et éventuellement en anaérobiose en présence de sels biliés (ou autre dérivé tensio-actif présentant des propriétés d'inhibition de croissance similaires), et également capables de faire fermenter le lactose (et le mannitol) avec production d'acide, de gaz et d'aldéhyde dans les 48 h lorsqu'on les fait incuber à une température comprise entre 35 °C et 37 °C.

Les organismes coliformes thermotolérants sont des organismes coliformes qui présentent les mêmes propriétés biologiques et de fermentation lorsqu'on les fait incuber à une température de 44 °C à 44,5 °C.

les *escherichia coli* présumés sont des organismes coliformes thermotolérants qui sont également capables de produire de l'indole à partir du tryptophane.

On peut considérer comme un *escherichia coli* présumé, un *escherichia coli* qui donne également un résultat positif lors de l'essai au rouge de méthyle et peut décarboxyler de l'acide L-glutamique, mais qui n'est pas capable de produire de l'acétylméthylcarbinol, d'utiliser le citrate comme seule source de carbone ou de croître dans un bouillon au cyanure de potassium (KCN).

Tableau B

Milieux de culture, réactifs et diluants

MILIEU D'ISOLEMENT

Bouillon lactosé

Milieu double concentration

Peptone	10 g
Lactose	10 g
Extrait de viande	6 g
Eau distillée	1000 ml

— dissoudre les ingrédients dans de l'eau bouillante.

— ajuster le pH si nécessaire de sorte qu'après stérilisation il soit de 6,9 ± 0,2. Préparer un milieu simple concentration par dilution du milieu double concentration avec un volume égal d'eau distillée.

Bouillon de MacConkey

Milieu double concentration.

Sels Biliés	10 g
Peptone	40 g
Lactose	20 g
Chlorure de sodium	10 g
Pourpre de bromocrésol [solution éthanolique à 1% (V/V)]	2 ml
Eau distillée	1000 ml

— dissoudre la peptone, le chlorure de sodium et les sels biliés dans l'eau en chauffant et conserver à 4 °C pendant toute une nuit. Filtrer alors que le mélange est froid, ajouter le lactose et dissoudre.

— ajuster le pH à 7,4 ± 0,2 et ajouter le pourpre de bromocréso1. Obligatoire

Milieu simple concentration

— Préparer le milieu simple concentration par dilution du milieu double concentration avec un volume égal d'eau distillée ou le préparer directement en divisant par deux la concentration des ingrédients.

— Répartir le milieu simple concentration par volumes de 5 ml et le milieu double concentration par volumes de 10 ml ou 50 ml dans des tubes à essai ou des flacons contenant une cloche de Durham. Placer en autoclave à 115 °C pendant 10 min.

Milieu lactosé amélioré au glutamate et au formiate

Milieu double concentration

Lactose	20 g
Sel de sodium de l'acide L(+) glutamique	12,7 g
Monochlorhydrate de L(+) arginine	0,048 g
Acide L(-) aspartique	0,04 g
L(-) Cystine	0,04 g
Formiate de sodium	0,5 g
Monohydrogénophosphate de potassium	1,8 g
Chorure d'armmonium	5 g
Sulfate de magnésium ($MgS0_4$, $7H_20$)	0,02 g
Chlorure de calcium ($CaCI_2$, $2H_20$)	0,02 g
Cristaux de citrate de fer (III)	0,02 g
Thiamine (hydrochlorure d'aneurine)	0,002 g
Acide nicotinique	0,002 g
Acide pantothénique	0,002 g
Pourpre de bromocrésol [solution à 1 % (m/m) dans l'éthanol]	2 ml
Eau distillée, compléter à	1000 ml

Le milieu est préparé de préférence par quantités de 10 litres ou plus, s'il n'est pas réparti dans des tubes à essai immédiatement, il convient de ne pas incorporer le lactose et la thiamine et de les ajouter uniquement avant l'utilisation. Il est plus facile d'ajouter certains ingrédients sous forme de solutions séparées préparées comme suit :

Solution 1

Monochlorate de L(+) arginine	0,4 g
Acide L(-) aspartique	0,48 g
Eau distillée	50 ml

Chauffer pour dissoudre.

Solution 2

L(-) cystine	0,4 g
hydroxyde de sodium (5 mol/l)	10 ml
Eau distillée	90 ml

Chauffer pour dissoudre.

Solution 3

Acide nicotinique	0,02 g
Acide pantothénique	0,02 g
Eau distillée	5 ml

Chauffer à froid.

Solution 4

Cristaux de citrate de fer	0,2 g
Eau distillée	10 ml

Chauffer pour dissoudre.

Solution 5

Chlorure de calcium ($CaCl_2$, $2H_20$)	5g
Eau distillée	100 ml
Acide chlorhydrique concentré	0,1 ml

Dissoudre à froid et stériliser à 121 °C pendant 20 min. Conserver comme solution mère.

Solution 6

Solution de thiamine à 0,1 % stérile dans de l'eau distillée.

Il est préférable de préparer cette solution en ajoutant le contenu d'une ampoule (100 mg) de façon aseptique à 99 ml d'eau distillée stérile. Cette solution doit être conservée à 4 °C et ce qui reste de cette solution éliminé après un délai de 6 semaines.

Afin de préparer 10 l de milieu double concentration, dissoudre les quantités appropriées de sel de sodium, acide L(+) glutamique, de formiate de sodium, monohydrogénophosphate de potassium, de chlorure d'ammonium et de sulfate de magnésium dans 9 l d'eau distillée chaude. Puis ajouter la totalité des solutions 1, 2, 3 et 4 et 4 ml de la solution 5. Ajuster le pH à 6,8 ou plus, si nécessaire, de sorte que le pH final après stérilisation soit de 6,7. Si le même matériel et les mêmes méthodes de stérilisation sont utilisés, il devrait toujours se produire la même variation de pH au cours de la stérilisation. Des essais préliminaires peuvent être nécessaires pour établir le pH correct avant stérilisation.

Après ajustement du pH, ajouter 20 ml d'une solution éthanolique à 1% de pourpre de bromocrésol. Compléter pour obtenir un volume final de 10 l. Ceci devrait nécessiter environ 810 ml d'eau distillée. Si le milieu entier n'est pas utilisé immédiatement, le mettre en bouteille de 500 ml et le placer à l'autoclave à 115 °C pendant 10 min. Pour l'emploi, ajouter si nécessaire, une quantité de lactose et de solution de thiamine (solution 6), laisser dissoudre, puis répartir en prises de 10 ml et 50 ml. Chaque tube à essai ou flacon doit contenir une cloche de Durham. Il est important de s'assurer, qu'après passage à l'autoclave et avant l'emploi, la cloche de Durham soit complètement remplie de milieu. Sinon, on risque d'obtenir un résultat positif erroné pour la production de gaz. Stériliser à 115 °C pendant 10 min ou placer dans une étuve à 100 °C durant 30 min pendant trois jours consécutifs.

Milieu simple concentration

— préparer un milieu simple concentration en diluant le milieu double concentration avec un égal volume d'eau distillée et répartir, en volume de 5 ml, dans des tubes contenant une cloche de Durham ;

— stériliser à 115 °C pendant 10 min ou placer dans une étuve à 100 °C durant 30 min pendant trois jours consécutifs

Note 6 : L'addition d'hydrolysat de caséine à 0,1% (m/m) exempt de vitamine peut donner des résultats plus rapides.

Bouillon tryptosé au laurylsulfate

Milieu double concentration

Tryptose	40 g
Lactose	10 g
Chlorure de sodium	10 g
Monohydrogénophosphate de potassium	5,5 g
Dihydrogénophosphate de potassium	5,5 g
Laurylsulfate de sodium de haute pureté	0,2 g
Eau distillée	1000 ml

— ajouter le tryptose, le chlorure de sodium, le lactose et les phosphates à l'eau et chauffer pour dissoudre ;

— ajouter le laurylsulfate de sodium et mélanger doucement pour éviter la formation de mousse ;

— ajuster le pH à 6,8 ± 0,2 ;

— préparer un milieu simple concentration en diluant le milieu double concentration avec un volume égal d'eau distillée ;

— répartir le milieu simple concentration en volumes de 5 ml et le milieu double concentration en volumes de 10 ml et de 50 ml. Chaque tube à essai ou flacon doit contenir une cloche de Durham ;

— placer à l'autoclave à 115 °C pendant 10 min ;

MILIEUX DE CONFIRMATION

Bouillon (bilié) lactosé au vert-brillant (pour production de gaz)

Peptone	10 g
Lactose	10 g
Bile de bœuf déshydratée	20 g
Vert-brillant [solution à 0,1 %(m/m)]	13 ml
Eau distillée, compléter à	1000 ml

— dissoudre la peptone dans 500 ml d'eau distillée ;

— ajouter 20g de bile de bœuf déshydratée dissoute dans 200 ml d'eau distillée. Cette solution devrait avoir un pH compris entre 7,0 et 7,5 ;

— compléter avec de l'eau distillée à environ 975 ml ;

— ajouter le lactose et ajuster le pH à 7,4 ;

— ajouter la solution de vert-brillant et compléter avec de l'eau distillée à 1000 ml ;

— répartir en prises de 5 ml dans des tubes à essai contenant des cloches de Durham renversées et placer à l'autoclave à 115 °C pendant 10 min.

Milieu (EC) (pour production de gaz)

Tryptose ou trypticase	20 g
Lactose	5 g
Mélange de sels biliés ou sels biliés n° 3	1,5 g
Monohydrogénophosphate de potassium	4 g
Dihydrogénophosphate de potassium	1,5 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	1000 ml

Avant stérilisation, répartir dans des tubes à essai de sorte que le milieu recouvre au moins partiellement la cloche de Durham après stérilisation.

Le pH devrait être de 6,9 après stérilisation.

Eau tryptonée (pour réaction à l'indole)

Certaines peptones donnant des résultats satisfaisants dans les essais à 35 °C ou 37 °C ne sont pas satisfaisantes pour l'essai à l'indole à 44 °C. La tryptone s'est avérée satisfaisante et est recommandée.

Tryptone	20 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	1000 ml

— dissoudre les ingrédients dans l'eau et ajuster le pH à 7,5 ;

— Répartir en volume de 5 ml et placer à l'autoclave à 115 °C pendant 10 min ;

Note 7 : L'addition de tryptophane D ou DL à 0,1% (m/m) peut améliorer la performance du milieu.

Bouillon tryptosé au mannitol, au laurylsulfate et au tryptophane

(Flacon unique pour production de gaz et d'indole)

Tryptose	20 g
Manitol	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Monohydrogénophosphate de potassium	2, 75 g
Dihydrogénophosphate de potassium	2,75 g
Laurylsulfate de sodium	0,1 g
Tryptophane L(-)	0,2 g
Eau distillée	1000 ml

— ajouter à l'eau le tryptose, le chlorure de sodium, le mannitol, les phosphates et le tryptophane et chauffer pour dissoudre ;

— ajouter le laurylsulfate de sodium et mélanger doucement pour éviter la formation de mousse ;

— ajuster le pH à pH 6,8 ± 0,2 ;

— répartir par volumes de 5 ml dans des tubes contenant une cloche de Durham ;

— placer à l'autoclave à 115 °C pendant 10 min.

RÉACTIFS

Réactif de Kovacs pour l'indole

p-Diméthylaminobenzaldéhyde	5 g
Alcool amylique	75 ml
Acide chlorhydrique (p = 1,18 g/ml)	25 ml

— dissoudre l'aldéhyde dans l'alcool amylique ;

— ajouter l'acide concentré avec soin. Mettre à l'abri de la lumière et conserver à 4 °C.

Note 8 : La coloration du réactif doit aller du jaune clair au brun clair; certains échantillons d'alcool amylique s'avèrent insatisfaisants et donnent une coloration foncée avec l'aldéhyde.

Réactif à l'oxydase

Dichlorate de *p*-phénylène diamine	0,1 g
Eau distillée	10 ml

Ce réactif ne se conserve pas et doit donc être préparé en petites quantités avant chaque utilisation.

DILUANTS

Diluant à la peptone (0,1 %)

Peptone	1 g
Eau distillée	1000 ml

— dissoudre la peptone dans environ 950 ml d'eau ;

— ajuster le pH avec la solution d'hydroxyde de sodium ou une solution d'acide chlorhydrique (l mol/l) de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 ± 0,1 ;

— compléter avec de l'eau pour obtenir 1000 ml, répartir en volumes utilisables et placer à l'autoclave à 121 °C ± 1 °C pendant 15 min.

Solution saline peptonée

Peptone	1 g
Chlorure de sodium	8,5 g
Eau distillée	1000 ml

— dissoudre les constituants dans environ 950 ml d'eau portée à ébullition ;

— ajuster le pH avec l'hydroxyde de sodium ou la solution d'acide chlorhydrique (l mol/l) de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,0 ± 0,1 ;

— compléter avec de l'eau pour obtenir 1000 ml, répartir en volumes utilisables et placer à l'autoclave à 121 °C ± 1 °C pendant 15 min.

Solution de Ringer (diluée au quart)

Chlorure de sodium	2,25 g
Chlorure de potassium	0, 1 05 g
Chlorure de calcium (anhydre)	0,12 g
Hydrogénocarbonate de sodium	0,05 g
Eau distillée	1000 ml

— dissoudre les ingrédients et répartir en volumes utilisables ;

— stériliser à l'autoclave à 121 °C ± 1 °C pendant 15 min. Le pH final devrait être de 7,0 ± 0,1.

Solution tampon au phosphate

Dihydrogénophosphate de potassium	42,5 mg
Chlorure de magnésium	190 mg
Eau distillée	1000 ml

Préparation

a) *Solution de phosphate*

— dissoudre 34 g de phosphate dans 500 ml d'eau distillée ;

— ajuster le pH à 7,2 ± 0,5 avec une solution d'hydroxyde de sodium à 1 mol/l et compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée.

b) *Solution de chlorure de magnésium*

dissoudre 38 g de chlorure de magnésium dans 1000 ml d'eau distillée.

Solution finale

Pour l'utilisation, ajouter 1,25 ml de la solution de phosphate (a) et 5,0 ml de solution de chlorure de magnésium (b) à 1000 ml d'eau distillée. Répartir en volumes utilisables et stériliser à l'autoclave à 121 °C ± 1 °C pendant 15 min. Le pH final doit être de 7,0 ± 0,1.

Gélose nutritive

Extrait de viande	1,0 g
Peptone	1,0 g
Chlorure de sodium	5 g
Gélose	15 g

— verser les ingrédients dans l'eau et chauffer pour dissoudre ;

— ajuster le pH à environ 8,2 au moyen d'hydroxyde de sodium (l mol/l) et faire bouillir pendant 10 min ;

— clarifier par filtration et régler le pH à 7,2 ±7,4 ;

— répartir dans des flacons de 100 ml de capacité et passer à l'autoclave à 121 °C ± 1 °C pendant 15 min.

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 23 Rajab 1433 correspondant au 13 juin 2012 rendant obligatoire la méthode de recherche et de dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réductrices (Clostridia).

———

Le ministre du commerce,

Vu la Loi n° 05-12 du 28 Joumada Ethania 1426 correspondant au 4 août 2005, modifiée et complétée, relative à l'eau ;

Vu le décret présidentiel n° 10-149 du 14 Joumada Ethania 1431 correspondant au 28 mai 2010 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 22 Dhou El Hidja 1426 correspondant au 22 janvier 2006, modifié et complété, fixant les proportions d'éléments contenus dans les eaux minérales naturelles et les eaux de source ainsi que les conditions de leur traitement ou les adjonctions autorisées ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de recherche et de dénombrement des spores micro-organismes anaérobies sulfito-réductrices.

Art. 2. — Pour la recherche et le dénombrement des spores micro-organismes anaérobies sulfito-réductrices, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 23 Rajab 1433 correspondant au 13 juin 2012.

Mustapha BENBADA.

ANNEXE

MÉTHODE DE RECHERCHE ET DE DÉNOMBREMENT DES SPORES DE MICRO-ORGANISMES ANAÉROBIES SULFITO-RÉDUCTEURS (CLOSTRIDIA)

La présente méthode spécifie la recherche et le dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (clostridia) par enrichissement dans un milieu liquide.

Le principe de la méthode est applicable à tous les types d'eau, y compris les eaux troubles.

1- DEFINITION

Pour les besoins de cette méthode, la définition suivante est applicable :

clostridia: micro-organismes anaérobies formant des spores et sulfito-réducteurs, appartenant à la famille des Bacillacées et au genre Clostridium.

2-PRINCIPE

La recherche des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (clostridia) dans un échantillon d'eau de volume déterminé, passe par les étapes suivantes ;

2.1 - Sélection des spores

Sélection des spores dans l'échantillon, par chauffage pendant une période de temps suffisante pour que les bactéries végétatives soient détruites.

2.2 - Culture par enrichissement

Recherche et énumération des spores des organismes anaérobies sulfito-réducteurs par inoculation de volumes de l'échantillon dans les milieux liquide d'enrichissement, suivie de l'incubation à 37 ± 1°C pendant 44 ± 4h dans des conditions anaérobies.

3 - MILIEUX DE CULTURE ET REACTIFS

3.1 - Principaux matériaux

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation des diluants et des milieux de culture, des composants de base déshydratés ou des milieux complets déshydratés. De la même façon, des préparations commerciales de réactifs peuvent être utilisées. Les prescriptions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques utilisés pour la préparation des milieux de culture et des réactifs doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou déminéralisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des micro-organismes dans les conditions de l'essai.

Les mesures du pH doivent être effectuées au pHmètre, et rapportées à la température de 25°C.

Si les milieux de culture préparés ne sont pas utilisés extemporanément, ils doivent, sauf spécification contraire, être conservés à l'obscurité à environ 4°C pendant 1 mois au maximum.

3.2 - Milieux de culture et diluant

3.2.1 - Diluant

Utiliser un des diluants indiqués dans la méthode de dénombrement des micro-organismes dans le milieu de culture.

3.2.2 - Milieu renforcé spécial pour les clostridia (DRCM)

3.2.2.1 - Milieu de base simple concentration

Composition

Viande digérée dans la peptone tryptique..... 10 g

Extrait de viande..... 10 g

Extrait de levure..... 1,5 g

Amidon..... 1 g

Acétate de sodium hydraté..... 5 g

Glucose..... 1 g

Chlorhydrate de L - cystine..... 0,5 g

Eau..... 1000 ml

Préparation

Mélanger la peptone, l'extrait de viande, l'acétate de sodium ainsi que l'extrait de levure à 800 ml d'eau.

Avec les 200 ml d'eau distillée qui restent, préparer une solution d'amidon comme suit : mélanger l'amidon avec un peu d'eau froide de manière à faire une pâte. Chauffer le reste de l'eau jusqu'à ce qu'elle commence à bouillir et l'introduire lentement dans la pâte, tout en agitant constamment.

Ajouter alors cette solution d'amidon au premier mélange et chauffer jusqu'à ce que le point d'ébullition soit atteint et que le mélange se dissolve.

A la fin, ajouter le glucose et le chlorhydrate de L-cystine : dissoudre.

Ajuster le pH en le faisant passer de 7, 1 à 7, 2 avec une solution d'hydroxyde de sodium à 1 mol / 1.

Transvaser une aliquote de 25 ml du milieu dans des flacons avec bouchons à vis de 25 ml de capacité. Stériliser à l'autoclave à 121 ± 1 °C pendant 15 min.

3.2.2.2 - Milieu de base double concentration

Préparer le milieu de base double concentration comme en 3.2.2.1, mais réduire le volume d'eau distillée de moitié.

Transvaser des aliquotes, respectivement, de 10 ml et de 50 ml du milieu, dans des flacons avec bouchons à vis, de capacités respectivement de 25 ml et 100 ml.

Stériliser à l'autoclave à 121 ± 1 °C pendant 15 mn.

3.2.3 - sulfite de sodium ($Na_2S_20_3$), solution à 4 % (m/m).

Dissoudre 4 g de sulfite de sodium anhydre dans 100 ml d'eau. Stériliser par filtration. Conserver entre 2 et 5 °C.

Il est conseillé de préparer une nouvelle solution tous les 14 jours.

3.2.4 - Citrate de fer (III) ($C_6H_5O_7Fe$) , solution à 7% (m/m).

Dissoudre 7 g de citrate de fer (III) dans 100 ml d'eau, stériliser par filtration.

Conserver entre 2 et 5 °C.

Il est conseillé de préparer une nouvelle solution tous les 14 jours.

3.2.5 - Milieu complet

3.2.5.1 - Le jour de l'analyse, mélanger des volumes égaux des solutions de sulfite de sodium (3.2.3) et de citrate de fer (III) (3.2.4).

3.2.5.2 - Ajouter 0,5 ml du mélange (3.2.5.1) dans chaque flacon de milieu de concentration simple (3.2.2.1) qui vient d'être chauffé et refroidir.

3.2.5.3 - Ajouter 0,4 ml du mélange (3.2.5.1) à chaque volume de 10 ml et 2 ml du mélange à chaque volume de 50 ml du milieu double concentration, ces volumes étant traités de manière semblable.

4- APPAREILLAGE ET VERRERIE DE LABORATOIRE

Verrerie et matériel de laboratoire couramment employés pour la bactériologie, sont :

4.1 - Flacons ou fioles avec bouchons à vis, en verre ou borosilicaté, de capacités 200 ; 100 et 25 ml.

4.2 - Pipettes volumétriques, de capacités 10 et 1 ml.

4.3 - Bains d'eau, contrôles thermiquement.

4.4 - Tubes à essai, de 150 mm x 13 mm.

4.5 - Fil de fer.

4.6 - Incubateurs, réglables à 37 ± 1°C.

5- ECHANTILLONNAGE

L'échantillonnage se fait dans des conditions appropriées.

6- MODE OPERATOIRE

6.1 - Traitement des échantillons

Se référer à la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture en ce qui concerne la méthode à suivre pour la conservation et le traitement des échantillons.

6.2 - Sélection des spores (technique)

Avant qu'il soit procédé à l'essai, l'échantillon d'eau doit être chauffé dans un bain d'eau à 75 ± 5°C pendant 15 mn à partir du moment où cette température a été atteinte. Un flacon similaire contenant le même volume d'eau que celui de l'échantillon pour essai doit être utilisé parallèlement comme témoin afin de vérifier le temps de chauffage nécessaire. La température de l'eau dans le flacon témoin peut être enregistrée de manière permanente à l'aide d'un thermomètre.

6.3 - Inoculation et incubation

Ajouter 50 ml de l'échantillon (6.2) à un flacon à capuchon à vis contenant 50 ml du milieu double concentration (3.2.5.3) .

Ajouter 10 ml de l'échantillon (6.2) à une série de cinq flacons à capuchon à vis de 25 ml contenant 25 ml du milieu double concentration (3.2.5.3).

Ajouter 1 ml de l'échantillon (6.2) à une série de cinq flacons à capuchon à vis de 25 ml contenant 25 ml du milieu simple concentration (3.2.5.2).

Si nécessaire, ajouter 1 ml d'une dilution au 1/10 de l'échantillon (6.2) à une série de cinq flacons à capuchon à vis contenant 25 ml du milieu simple concentration (3.2.5.2).

Afin de procéder à un examen qualitatif de 100 ml d'eau potable ou d'eau en bouteille sans faire un comptage du NPP, utiliser une fiole de 200 ml contenant un mélange de 100 ml du milieu double concentration (3.2.5.3) et de 100 ml de l'échantillon (6.2) .

Si nécessaire , remplir tous les flacons avec le milieu simple concentration (3.2.5.2) de façon à amener le liquide au niveau du col et s'assurer qu'il ne renferme qu'un très petit volume d'air; fermer alors les flacons hermétiquement ou incuber dans des conditions anaérobies.

Incuber les flacons inoculés à 37 °C ± 1 °C pendant 44 ± 4 h.

Note : Des volumes contenant du bouillon de culture dans des flacons en verre hermétiquement fermés peuvent exploser en raison de la production de gaz . L'utilisation d'un fil de fer chauffé au rouge et placé dans le milieu avant incubation peuvent favoriser l'anaérobiose.

6.4 - Interprétation

Les flacons dans lesquels on observe un noircissement résultant de la réduction de sulfite et de la précipitation du sulfure de fer (II) doivent être considérés comme étant positifs.

7- EXPRESSION DES RESULTATS

Exprimer les résultats en conformité avec la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture.

Arrêté du 21 Moharram 1434 correspondant au 5 décembre 2012 rendant obligatoire la méthode de détection et de dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'eau par filtration sur membrane.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu la loi n° 05-12 du 28 Joumada Ethania 1426 correspondant au 4 août 2005, modifiée et complétée, relative à l'eau ;

Vu le décret présidentiel n° 12-326 du 17 Chaoual 1433 correspondant au 4 septembre 2012 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05 - 465 du 4 Dhou El Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 22 Dhou El Hidja 1426 correspondant au 22 janvier 2006, modifié et complété, fixant les proportions d'éléments contenus dans les eaux minérales naturelles et les eaux de source ainsi que les conditions de leur traitement ou les adjonctions autorisées ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications micro biologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détection et de dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'eau par filtration sur membrane.

Art. 2. — Pour la détection et le dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'eau par filtration sur membrane, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 21 Moharram 1434 correspondant au 5 décembre 2012.

Mustapha BENBADA.

— — — — — — —

ANNEXE

Méthode de détection et de dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'eau par filtration sur membrane

La présente méthode spécifie une technique permettant d'isoler et de dénombrer *Pseudomonas aeruginosa* dans des échantillons d'eau embouteillée, par filtration sur membrane. Cette méthode peut également être appliquée à d'autres types d'eau présentant une faible flore interférente, par exemple les eaux de piscine et les eaux destinées à la consommation humaine.

1. DÉFINITION

Pour les besoins du présent document, la définition suivante s'applique.

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Micro-organismes se développant sur des milieux sélectifs contenant du cétrimide et produisant de la pyocyanine ou micro-organismes se développant sur des milieux sélectifs contenant du cétrimide, oxydase positive, donnant lieu à une fluorescence sous rayonnement ultraviolet (360 ± 20) nm et également capables de produire de l'ammoniac à partir d'acétamide.

2. PRINCIPE

2.1 Filtration

Un volume mesuré de l'échantillon d'eau ou une dilution de l'échantillon est filtré sur une membrane filtrante de porosité 0,45 µm. La membrane filtrante est placée sur le milieu sélectif et incubée dans les conditions spécifiées pour le milieu.

2.2 Dénombrement

Le nombre de *Pseudomonas aeruginosa* présumés est obtenu par comptage du nombre de colonies caractéristiques formées sur la membrane filtrante après incubation. Les colonies produisant de la pyocyanine sont considérées comme *Pseudomonas aeruginosa* confirmés mais les colonies qui produisent une fluorescence ou celles de couleur brun rougeâtre nécessitent une confirmation.

2.3 Confirmation

Repiquage des colonies à confirmer à partir de la membrane sur des boîtes de gélose nutritive (mais voir annexe B). Après incubation, les cultures qui ne présentaient initialement pas de fluorescence sont soumises au test de recherche de l'oxydase, puis les cultures oxydase positive sont soumises au test de production de fluorescéine et examinées pour déceler leur aptitude éventuelle à produire de l'ammoniac à partir d'acétamide.

Les cultures qui présentaient initialement une fluorescence sont examinées pour déceler leur aptitude éventuelle à produire de l'ammoniac à partir d'acétamide.

3. DILUANTS, MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS

Sauf spécifications contraires, utiliser des réactifs de qualité analytique pour la préparation des milieux de culture et des diluants. Préparer le milieu comme suit et ajouter les agents sélectifs aux concentrations données ou utiliser des milieux et réactifs disponibles dans le commerce, préparés conformément aux instructions du fabricant. Préparer les milieux et réactifs en utilisant de l'eau distillée ou de l'eau de pureté équivalente et exempte de substances pouvant inhiber la croissance dans les conditions de l'essai.

3.1 Milieu de culture

Pour déterminer *Pseudomonas aeruginosa*, utiliser le milieu suivant :

3.1.1 Base gélosée pour *Pseudomonas* gélose CN

3.1.1.1 Composition

Peptone de gélatine.....16,0 g

Hydrolysat de caséine.....10,0 g

Sulfate de potassium

(Anhydre) (K_2SO_4).....10,0 g

Chlorure de magnésium

(Anhydre) ($MgCl_2$).....1,4 g

Glycérol.....10 ml

Gélose.....11,0 g à 18,0 g

Eau (distillée ou équivalent).....1 000 ml

Note — La quantité de gélose requise dépend du pouvoir gélifiant. Respecter les instructions du fabricant de la gélose utilisée.

Supplément CN

Bromure d'hexadécyltriméthyl ammonium (cétrimide).....0,2 g

Acide nalidixique.....0,015 g

3.1.1.2 Préparation

Mettre en suspension la peptone, l'hydrolysat de caséine, le sulfate de potassium, le chlorure de magnésium et la gélose dans 1 000 ml d'eau distillée (ou l'équivalent). Ajouter 10 ml de glycérol. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète et stériliser à l'autoclave à (l21±3) °C pendant 15 min. Laisser le milieu refroidir à (45 à 50) °C.

Ajouter le supplément CN réhydraté dans 2 ml d'eau distillée stérile, bien mélanger et ajouter au milieu de base stérile fondu. Mélanger de nouveau et verser dans des boîtes de Petri stériles de façon à obtenir une épaisseur minimale de gélose de 5 mm. Il convient que le pH final du milieu solidifié soit égal à 7,1 ± 0,2 à 25 °C. Conserver les boîtes ainsi préparées à l'abri de la lumière, en évitant toute dessiccation, à une température de (5 ± 3) °C et les utiliser dans un délai d'un mois. Ne pas conserver la gélose fondue pendant plus de 4 h. Ne pas faire fondre de nouveau le milieu.

3.2 Milieux de confirmation et réactifs

3.2.1 Milieu de King B

3.2.1.1 Composition

Peptone.....20,0 g

Glycérol.....10 ml

Hydrogénophosphate

de potassium (K_2HPO_4).....1,5 g

Sulfate de magnésium heptahydraté

($MgSO_4,7H_2O$).....1,5 g

Gélose.....15,0 g

Eau (distillée ou équivalent).....1 000 ml

3.2.1.2 Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau par chauffage. Laisser refroidir à une température de (45 à 50) °C et ajuster le pH à 7,2 ± 0,2 à 25 °C, en utilisant soit de l'acide chlorhydrique, soit de l'hydroxyde de sodium. Répartir le milieu en aliquotes de 5 ml dans des tubes de culture bouchés et autoclavés à (121 ± 3) °C pendant 15 min. Laisser les tubes refroidir et se solidifier en position inclinée.

Conserver à l'abri de la lumière à (5 ± 3) °C et les utiliser dans les trois (3) mois.

3.2.2 Bouillon d'acétamide

3.2.2.1 Composition

Solution A

Dihydrogénophosphate de

potassium (KH_2PO_4).....1,0 g

Sulfate de magnésium (anhydre) ($MgSO_4$).....0,2 g

Acétamide.....2,0 g

Chlorure de sodium (NaCI).....0,2 g

Eau (distillée ou équivalent, exempte d'ammoniac).....900 ml

Dissoudre les composants dans l'eau et ajuster ensuite le pH à 7,0 ± 0,5, à 25 °C, en utilisant soit de l'acide chlorhydrique, soit de l'hydroxyde de sodium.

Attention - L'acétamide est cancérigène et irritant. Des précautions particulières doivent donc être prises lors de la pesée, de la préparation et de la mise au rebut du milieu.

Solution B

Molybdate de sodium

(Na_2MoO_4, $2H_2O$).....0,5 g

Sulfate de fer heptahydraté

($FeSO_4,7H_2O$).....0,05 g

Eau.....100 ml

3.2.2.2 Préparation

Pour préparer le bouillon d'acétamide, ajouter 1 ml de la solution (B) à 900 ml d'une solution (A) fraîchement préparée (3.2.2.1). Ajouter de l'eau sous agitation constante jusqu'à obtention d'un volume total de 1 litre.

Répartir ce mélange en aliquotes de 5 ml dans des tubes de culture. Boucher les tubes et les stériliser à l'autoclave à (121 ± 3) °C pendant 15 min. Conserver à l'abri de la lumière à (5 ± 3) °C et les utiliser dans les trois (3) mois.

3.2.3 Gélose nutritive

3.2.3.1 Composition

Peptone.....5,0 g

Extrait de viande.....1,0 g

Extrait de levure.....2,0 g

Chlorure de sodium (NaCl).....5,0 g

Gélose.....15,0 g

Eau.....1 000 ml

3.2.3.2 Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau par chauffage. Stériliser à l'autoclave à (121 ± 3) °C pendant 15 min. Il convient que le pH du milieu ainsi préparé et solidifié soit égal à 7,4 ± 0,2 à 25 °C. Sécher les boîtes pour éliminer toute humidité excessive de la surface, avant utilisation. Conserver les boîtes ainsi préparées à l'abri de la lumière à (5 ± 3) °C et les utiliser dans un délai d'un mois.

3.2.4 Réactif pour la recherche de l'oxydase

3.2.4.1 Composition

Dichlorhydrate detétraméthyle-*p*-phénylènediamine.....0,1 g

Eau.....10 ml

3.2.4.2 Préparation

Immédiatement avant utilisation, dissoudre le dichlorhydrate de tétraméthyle-*p*-phénylènediamine dans l'eau et mettre à l'abri de la lumière. Ce réactif n'étant pas stable, le préparer en petites quantités juste avant de l'utiliser.

Il est également possible d'utiliser des tests oxydase disponibles dans le commerce.

3.2.5 Réactif de Nessler

3.2.5.1 Composition

Chlorure mercurique ($HgCi_2$).....10 g

Iodure de potassium (KI).....7 g

Hydroxyde de sodium (NaOH).....16 g

Eau (exempte d'ammoniac).....jusqu'à 100 ml

Dissoudre 10g de $HgCi_2$ et 7 g de KI dans une petite quantité d'eau, puis en agitant, ajouter ce mélange lentement à une solution d'eau froide de 16 g de NaOH dissous dans 50 ml d'eau. Diluer à 100 ml. Conserver dans de la verrerie borosilicatée fermée par un bouchon en caoutchouc à l'abri de la lumière du soleil, pendant une durée maximale d'un an.

Note : Le chlorure mercurique ($HgCl_2$) est toxique - éviter toute ingestion.

4. APPAREILLAGE ET VERRERIE

Utiliser le matériel courant des laboratoires de microbiologie.

4.1 Verrerie

Avant utilisation, stériliser toute la verrerie à (170 ± 5) °C pendant 1 h, au four ou à (121 ± 3) °C pendant 15 min, à l'autoclave.

4.2 Incubateur, réglable à (36 ± 2) °C.

4.3 Lampe à rayonnement ultraviolet, pouvant émettre un rayonnement d'une longueur d'onde de (360 ± 20) nm.

4.4 Membranes filtrantes stériles, ayant une porosité nominale de 0,45 µm.

5. ECHANTILLONNAGE

L'échantillonnage se fait dans les conditions appropriées.

6. MODE OPÉRATOIRE

6.1 Généralités

Appliquer la technique de filtration sur membrane décrite dans la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture, lignes directrices générales.

6.2 Filtration sur membrane

Filtrer des volumes de l'échantillon d'eau ou des portions d'une dilution sur une membrane filtrante stérile en esters de cellulose de diamètre de pore nominal de 0,45 µm. Comme spécifié dans la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture, lignes directrices générales, placer chaque membrane sur une boîte de Petri contenant de la gélose avec supplément CN (3.1) en veillant à ne pas emprisonner d'air sous la membrane.

6.3 Incubation des boîtes

Incuber les boîtes de Petri à (36 ± 2) °C pendant (44 ± 4) h dans des récipients et protéger contre toute dessiccation.

6.4 Examen des membranes

Examiner les membranes pour vérifier la croissance des cultures après (22 ± 2) h et (44 ± 4) h.

Compter toutes les colonies produisant une pigmentation bleu-vert (pyocyanine) comme *Pseudomonas aeruginosa* confirmés.

Examiner les membranes sous rayonnement ultraviolet. Il convient d'éviter toute exposition prolongée à l'éclairage UV car les colonies peuvent être tuées et donc ne pas se développer sur les milieux de confirmation. Compter les colonies ne produisant pas de pyocyanine et donnant lieu à une fluorescence comme *Pseudomonas aeruginosa* présumés et confirmer leur identité en utilisant le bouillon d'acétamide décrit ci-après.

Compter toutes les autres colonies produisant une pigmentation brune-rougeâtre et ne produisant pas de fluorescence comme *Pseudomonas aeruginosa* présumés et confirmer leur identité en utilisant un test oxydase, le bouillon d'acétamide et le milieu de King B décrit ci-après. La lecture après (22 ± 2) h est réalisée dans le cas de colonies envahissantes, lesquelles peuvent apparaître au bout de (44 ± 4) h. Il est recommandé de prendre en compte le dénombrement le plus élevé pour calculer le nombre de « *Pseudomonas aeruginosa* » décrit en (7).

Le Tableau 1 récapitule la sélection des colonies et les étapes de confirmation.

Tableau 1 - Étapes requises pour la confirmation des colonies se développant sur la gélose CN

Description des colonies sur gélose CN	Ammoniac à partir d'acétamide	Production d'oxydase	Fluorescence sur milieu King B	Confirmés comme *Pseudomonas aeruginosa*
Bleu-vert	NT[a]	NT	NT	OUI
Fluorescence	+	NT	NT	OUI
(pas bleu-vert)				
Brun rougeâtre	+	+	+	OUI
Autres types	NT	NT	NT	NON

[a] NT : Non testé.

6.5 Confirmation

6.5.1 Gélose nutritive

Repiquer toutes les colonies nécessitant une confirmation ou, si cela est irréalisable, autant de colonies que possible (la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture, lignes directrices générales à partir de la membrane et incuber pendant (22 ± 2) h à (36 ± 2) °C). Vérifier la pureté des repiquages et soumettre les colonies initialement brunes-rougeâtres au test de recherche de l'oxydase (6.5.2).

6.5.2 Test oxydase

Verser 2 ou 3 gouttes de réactif pour la recherche de l'oxydase (3.2.4) fraîchement préparé sur un morceau de papier-filtre placé dans une boîte de Petri.

À l'aide d'une anse métallique en platine (pas en Nichle-chrome) ou en plastique, d'une baguette ou d'une pipette en verre, étaler une partie de la culture sur le papier-filtre préparé. La réaction est considérée comme positive lorsqu'une coloration bleu-pourpre foncé apparaît dans les 10 s. Il est également possible d'utiliser des tests oxydase disponibles dans le commerce en suivant les instructions du fabricant.

6.5.3 Milieu de King B

Repiquer les colonies brunes rougeâtres oxydase positive obtenues en (6.5.1) sur un milieu de King B et incuber cinq jours au plus, à une température de (36 ± 2) °C. Examiner quotidiennement la culture sous un rayonnement UV et noter la présence d'une éventuelle fluorescence. Enregistrer comme positive toute fluorescence apparue dans les cinq jours.

6.5.4 Bouillon d'acétamide

Ensemencer un tube à l'aide du repiquage obtenu en (6.5.1) et incuber à (36 ± 2) °C pendant (22 ± 2) h. Ajouter 1 ou 2 gouttes de réactif de Nessler (3.2.5) et examiner les tubes afin de déceler une production éventuelle d'ammoniac se traduisant par une coloration allant du jaune au rouge brique, selon la concentration.

6.5.5 Dénombrement

Compter comme « *Pseudomonas aeruginosa* » confirmés toutes les colonies produisant de la pyocyanine (pigmentation bleu-vert) ou oxydase positive, donnant lieu à une fluorescence sous rayonnement UV (6.4) et (6.5.3.) et capables de produire de l'ammoniac à partir d'acétamide (6.5.4).

Note — Les colonies qui présentent une fluorescence sur la première membrane sont toujours oxydase positive et n'ont donc pas besoin d'être soumises au test oxydase (Tableau 1).

7. EXPRESSION DES RESULTATS

A partir du nombre de colonies caractéristiques dénombrées sur les membranes et en tenant compte du nombre d'essais de confirmation réalisés, calculer le nombre de « *Pseudomonas aeruginosa* » confirmés présents dans un volume d'eau déterminé. Pour l'eau minérale, l'eau de source et les autres eaux en bouteille, le volume est de 250ml. Pour les autres eaux, le volume est généralement de 100 ml.

Calculer le nombre de « *Pseudomonas aeruginosa* » par volume d'échantillon d'eau étudié comme suit :

$$P + F\,(^{c}F / {}^{n}F) + R\,(^{c}R / {}^{n}R)$$

P : est le nombre de colonies bleu-vert, toutes ayant été comptées comme cibles confirmées ;

F : est le nombre de colonies fluorescentes ;

R : est le nombre de colonies brun rougeâtre ;

^{n}F **:** est le nombre de colonies fluorescentes ayant fait l'objet d'une détection de production d'ammoniac ;

^{c}F **:** est le nombre de colonies fluorescentes ayant produit de l'ammoniac ;

^{n}R **:** est le nombre de colonies brun rougeâtre ayant fait l'objet d'une détection de production d'ammoniac, d'une recherche de l'oxydase et de fluorescence sur le milieu de King B ;

^{c}R : est le nombre de colonies brun rougeâtre ayant produit de l'ammoniac, oxydase positive et fluorescentes sur le milieu de King B.

Une autre solution consiste à exprimer les résultats qualitativement en indiquant la présence ou l'absence de « *Pseudomonas aeruginosa* » dans le volume d'eau étudié.

Note A

Informations complémentaires sur « *Pseudomonas aeruginos* »

Pseudomonas aeruginosa est l'espèce type du genre *Pseudomonas.*

C'est une bactérie Gram négative, non sporulée, oxydase positive et catalase positive. Elle présente un métabolisme oxydatif tel qu'indiqué par l'essai selon Hugh et Leifson, réduit généralement les nitrates au-delà des nitrites et produit de l'ammoniac à partir de la dégradation de l'acétamide.

La plupart des souches (98 %) produisent un pigment fluorescent soluble dans l'eau. La majorité des souches sont capables de croître à 42 °C mais pas à 4 °C, ce qui différencie « *Pseudomonas aeruginosa* » de « *Pseudomonas fluorescens* » qui croît à 4 °C et non à 42 °C. Elle liquéfie la gélatine et hydrolyse la caséine mais pas l'amidon. Plus de 90 % des souches produisent le pigment pyocyanine (bleu-vert).

Note B

Autres milieux

Il est possible d'utiliser d'autres milieux que la gélose nutritive à condition qu'ils ne soient pas sélectifs et qu'ils ne contiennent pas d'hydrate de carbone fermentescible.

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DU COMMERCE

DIRECTION GÉNÉRALE DU CONTRÔLE ÉCONOMIQUE ET DE LA RÉPRESSION DES FRAUDES

Direction des Laboratoires d'Essais et d'Analyses de la Qualité

MÉTHODES OFFICIELLES D'ANALYSES RELATIVES AUX DIVERS PRODUITS

Sommaire

1. Arrêté du 11 Octobre 2006 relatif à la méthode de dosage de l'aflatoxine B1, et la somme des aflatoxine B1, B2, G1 et G2 dans les céréales, les fruits a coque et les produits dérivés. (JO n° 06 - 2007)	**01**
2. Arrêté du 21 novembre 2011 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en iode dans le sel alimentaire. (JO n° 07 - 2013)	**05**
3. Arrêté du 31 mars 2013 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en chlorures des produits dérivés des légumes. (JO n° 49 - 2013)	**07**

ARRETES, DECISIONS ET AVIS

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 19 Ramadhan 1427 correspondant au 11 octobre 2006 rendant obligatoire la méthode de dosage de l'aflatoxine B_1 et la somme des aflatoxines B_1, B_2, G_1 et G_2 dans les céréales, les fruits à coque et les produits dérivés.

— — — —

Le ministre du commerce ;

Vu le décret présidentiel n° 06-176 du 27 Rabie Ethani 1427 correspondant au 25 mai 2006 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-467 du 8 Dhou El Kaada 1426 correspondant au 10 décembre 2005 fixant les conditions et les modalités de contrôle aux frontières de la conformité des produits importés ;

Vu l'arrêté du 14 Joumada Ethania 1416 correspondant au 7 novembre 1995 relatif aux spécifications techniques et aux règles applicables à l'importation des produits alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de dosage de l'aflatoxine B1 et la somme des aflatoxines B_1, B_2, G_1 et G_2 dans les céréales, les fruits à coque et les produits dérivés.

Art. 2. — Pour le dosage de l'aflatoxine B_1 et la somme des aflatoxines B_1, B_2, G_1 et G_2 dans les céréales, les fruits à coque et les produits dérivés, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 19 Ramadhan 1427 correspondant au 11 octobre 2006 .

Lachemi DJAABOUBE.

ANNEXE

METHODE DE DOSAGE DE L'AFLATOXINE B_1 ET DE LA SOMME DES AFLATOXINES B_1, B_2, G_1 et G_2 DANS LES CEREALES, LES FRUITS A COQUE ET LES PRODUITS DERIVES

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode est applicable pour la determination des teneurs en aflatoxines supérieures à 8 µg/kg.

2. PRINCIPE

L'échantillon pour essai est extrait avec un mélange d'eau et de méthanol. L'extrait d'échantillon est filtré, dilué avec de l'eau et déposé sur une colonne d'immunoaffinité contenant des anticorps spécifiques des aflatoxines B_1, B_2, G_1 et G_2. Les aflatoxines sont isolées, purifiées et concentrées sur la colonne et libérées des anticorps avec du méthanol. Les aflatoxines sont quantifiées par chromatographie liquide haute performance en phase inversée (CLHP) avec détection par fluorescence et dérivation post-colonne à l'iode.

3. REACTIFS

3.1 Généralités

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue.

3.2 Chlorure de sodium.

3.3 Iode sous forme de cristaux.

3.4 Aflatoxines, sous forme de cristaux ou de film, en ampoules.

— protéger suffisamment de la lumière du jour le laboratoire où sont effectuées les analyses ;

— protéger de la lumière les solutions d'aflatoxines (les conserver dans l'obscurité, utiliser une feuille d'aluminium ou de la verrerie ambrée).

3.5 Acétonitrile, de qualité CLHP.

3.6 Méthanol, de qualité analytique.

3.7 Méthanol, pour CLHP.

3.8 Toluène

3.9 Solvant d'extraction

Mélanger 7 parties en volume de méthanol (3.6) avec 3 parties en volume d'eau.

3.10 Colonne d'immunoaffinité

La colonne d'immunoaffinité (IA) contient des anticorps dirigés contre les aflatoxines B_1, B_2, G_1 et G_2. La capacité minimale de liaison de la colonne d'immunoaffinité ne doit pas être inférieure à 100 ng d'aflatoxine B_1 et la récupération pour les aflatoxines B_1, B_2 et G_1 ne doit pas être inférieure à 80 %, et à 60 % pour l'aflatoxine G_2, lorsqu'on applique sur la colonne d'IA une solution étalon de 5 ng de chaque toxine dans 15 ml d'un mélange de méthanol et d'eau (une partie en volume de méthanol pour 1 + 3,4 parties en volume d'eau). Il convient que la colonne d'IA comprenne un réservoir de solvant approprié, par exemple une seringue avec un adaptateur.

3.11 Phase mobile

Mélanger 3 parties en volume d'eau avec 1 partie en volume d'acétonitrile (3.5) et 1 partie en volume de méthanol (3.7). Dégazer la solution avant de l'utiliser.

3.12 Réactif de dérivation post-colonne

Dissoudre 100 mg d'iode (3.3) dans 2 ml de méthanol (3.6). Ajouter 200 ml d'eau. Agiter pendant 1 heure puis filtrer avec un filtre de 0,45 µm de porosité (4.8). Préparer la solution la semaine même de l'utilisation et la stocker dans l'obscurité ou dans un flacon en verre brun. Agiter pendant 10 min. avant utilisation.

3.13 Mélange de toluène/acétonitrile

Mélanger 98 parties en volume de toluène (3.8) avec 2 parties en volume d'acétonitrile (3.5).

3.14 Solutions mères d'aflatoxines

Dissoudre de l'aflatoxine B_1, B_2, G_1 et G_2 séparément dans le mélange toluène/acétonitrile (3.13) afin d'obtenir des solutions séparées contenant 10 µg/ml..

Pour déterminer la concentration exacte d'aflatoxine dans chaque solution mère, enregistrer le spectre d'absorption entre une longueur d'onde de 330 nm et 370 nm dans les cuves en quartz de 1 cm (4.8) d'un spectromètre, le mélange toluène/acétonitrile (3.13) étant la cuve de référence.

Calculer la concentration massique de chaque aflatoxine, ρ_i exprimée en microgrammes par millilitre, à l'aide de l'équation (1) ci – après :

$$\rho_i = \frac{A_{max} \times M_i \times 100}{\varepsilon_i \times d}$$

où :

A_{max} : est l'absorbance déterminée au maximum du spectre d'absorption ;

M_i : est la masse moléculaire relative de chaque aflatoxine, en grammes par mole ;

ε_i : est l'absorptivité molaire de chaque aflatoxine dans le mélange toluène/acétonitrile (3.13), en mètres carrés par mole ;

d : est le trajet optique de la cellule, en centimètres.

M_i et ε_i : sont exprimés dans le tableau (1) ci-après :

Aflatoxine	M_i g/mol	ε_i m²/mol
B_1	312	1930
B_2	314	2040
G_1	328	1660
G_2	330	1790

Tableau 1 - Masse moléculaire relative et absorptivité molaire des aflatoxines B_1, B_2, G_1 et G_2 (mélange de toluène et d'acétonitrile).

3.15 Solution mère d'aflatoxines mélangées

Préparer une solution mère contenant 500 ng/l d'aflatoxine B_1, 125 ng/l d'aflatoxine B_2, 250 ng/l d'aflatoxine G_1 et 125 ng/l d'aflatoxine G_2 dans le mélange toluène/acétonitrile (3.13). Lorsque la solution doit être stockée, peser le récipient et enregistrer toute modification quand la solution doit être utilisée. Envelopper soigneusement le récipient avec une feuille d'aluminium et stocker à environ 4 °C.

3.16. Solutions étalons d'aflatoxines mélangées

Transvaser chaque quantité spécifiée dans le tableau (2) de la solution mère d'aflatoxines mélangées (3.15) dans une série de trois fioles jaugées de 2 ml (4° C).

Laisser les solutions s'évaporer à sec sous un flux d'azote à température ambiante. Ajouter 1 ml de méthanol dans chaque récipient, mélanger, diluer jusqu'au trait avec de l'eau et mélanger à nouveau. Préparer la solution le jour de l'utilisation.

Solution étalon	Prélevé sur la solution mère (µl) (3.15)	Concentration massique ng/ml			
		B_1	B_2	G_1	G_2
1	60	15,0	3,75	7,50	3,75
2	40	10,0	2,50	5,00	2,50
3	20	5,00	1,25	2,50	1,25
4	10	2,50	0,625	1,25	0,625

Tableau 2 - Préparation des solutions étalons

Les valeurs indiquées dans ce tableau sont données à titre indicatif. La gamme étalon couvre les concentrations des échantillons.

3.17 Acide sulfurique, $c(H_2SO_4) = 2$ mol/l

4. APPAREILLAGE

4.1 Appareillage courant de laboratoire

La verrerie de laboratoire entrant en contact avec les solutions aqueuses d'aflatoxines doit être plongée dans de l'acide sulfurique (2 mol/l) pendant plusieurs heures, puis bien rincée à l'eau (3 fois par exemple) afin de retirer toute trace d'acide. Vérifier (3.16) l'absence d'acide avec du papier pH.

- Ce traitement est nécessaire car l'utilisation de verrerie lavée sans acide peut provoquer des pertes d'aflatoxines.

Dans la pratique, ce traitement est nécessaire pour les ballons à fond rond, les fioles jaugées, les éprouvettes graduées, les flacons ou tubes pour solutions d'étalonnage et extraits finaux (notamment les fioles des échantillonneurs automatiques) et les pipettes Pasteur lorsqu'elles sont utilisées pour transvaser des solutions d'étalonnage ou des extraits.

4.2 Broyeur, comprenant un bol de 500 ml et un couvercle.

4.3 Papier-filtre plissé, par exemple de 24 cm de diamètre.

4.4 Papier-filtre à microfibres de verre, par exemple de 11 cm de diamètre.

4.5 Fioles jaugées, par exemple de 2 ml.

4.6 Spectromètre, pouvant balayer des longueurs d'ondes comprises entre 200 nm et 400 nm.

4.7 Cuves en quartz, avec un trajet optique de 1 cm et sans absorption sensible dans les longueurs d'ondes comprises entre 300 nm et 370 nm.

4.8 Filtre à membrane pour les solutions aqueuses, en polytétrafluoroéthylène (PTFE), de 4 mm de diamètre et de 0,45 µm de porosité.

4.9 Appareillage CLHP, se composant des éléments suivants :

4.9.1 Pompe de chromatographie liquide, adaptée pour un débit de 1 ml/min.

4.9.2 Système d'injection, vanne d'injection munie d'une boucle de 50 µl ou système équivalent.

4.9.3 Colonne analytique de séparation en phase inversée, par exemple C18, garantissant l'obtention d'une résolution des pics d'aflatoxines B_1, B_2, G_1 et G_2 à partir de la ligne de base, ces pics étant bien distincts des autres pics.

— longueur de 250 mm ;

— diamètre intérieur de 4,6 mm ;

— particules sphériques de 5 µm.

Il est possible d'utiliser des colonnes plus courtes.

4.9.4 Système de dérivation post-colonne, comprenant une deuxième pompe sans impulsion (non péristaltique) et une pièce en T sans volume mort, avec un tube en polytétrafluoéthylène (PTFE) ou en acier inoxydable d'une longueur comprise entre 3000 mm et 5000 mm et d'un diamètre intérieur de 0,5 mm, ainsi qu'un bain de chauffage ou un réacteur de post-colonne pour la réaction à l'iode.

4.10 Détecteur de fluorescence, avec une longueur d'onde d'excitation réglée à 365 nm et une longueur d'onde d'émission à 435 nm (pour les instruments à filtre : longueur d'onde d'émission > 400 nm). Il doit être possible de détecter au minimum 0,05 ng d'aflatoxine B_1 par volume d'injection (en l'occurrence 50 µl).

5. MODE OPERATOIRE

5.1 Extraction

Peser 25 g, à 10 mg près, d'échantillon pour essai homogénéisé dans le bol du broyeur, ajouté 5 g de chlorure de sodium (3.2) et 125 ml de solvant d'extraction (3.9), puis homogénéiser au moyen d'un mélangeur pendant 2 minutes à grande vitesse.

Il convient de vérifier que la vitesse de mélange ne diminue pas l'efficacité de l'extraction.

Filtrer avec un papier-filtre plissé (4.3). Introduire au moyen d'une pipette 15 ml ($V2$) du filtrat dans une fiole conique de dimensions appropriées, Ajouter 30 ml d'eau, boucher la fiole et mélanger. Avant de commencer la chromatographie sur colonne d'immunoaffinité, filtrer l'extrait dilué sur un papier-filtre à microfibres de verre (4.4). Il convient que le filtrat ($V3$) soit limpide ; dans le cas contraire, filtrer à nouveau. Traiter immédiatement selon (5.2).

5.2 Purification

Préparer la colonne d'immunoaffinité puis procéder à la purification. A l'aide d'une pipette, déposer 15 ml ($V4$) du deuxième filtrat ($V3$) dans le réservoir de solvant de la colonne (3.10). Recueillir l'éluat de méthanol ou d'acétonitrile (en fonction du produit) dans la fiole jaugée de 2 ml (4.5). Diluer jusqu'au trait avec de l'eau ($V5$). Mélanger, puis procéder conformément à (5.3).

Pour leur analyse par CLHP, les solutions échantillons et les solutions étalons doivent contenir le même solvant ou le même mélange de solvants.

- Les méthodes de dépôt sur les colonnes d'immunoaffinité, le lavage de la colonne et l'éluant variant légèrement d'un fabricant de colonne à l'autre, il convient de suivre de façon précise les instructions spécifiques fournies avec les colonnes.

Veiller à ne pas dépasser la capacité maximale de la colonne.

5.3 Conditions d'emploi de la CLHP

Raccorder l'orifice de sortie de la colonne de séparation à l'un des bars en T (4.9.4) à l'aide d'un petit morceau de tube d'un diamètre intérieur de 0,25 mm par exemple. Raccorder au deuxième bras du T l'orifice de sortie de la deuxième pompe sans pulsion devant délivrer le réactif pour la dérivation post-colonne. Raccorder l'une des

extrémités d'un serpentin en PTFE ou en acier inoxydable (4.9.4) au troisième bras du T, et l'autre extrémité au détecteur. A l'aide d'une étuve ou d'un bain-marie, maintenir le serpentin à une température de réaction de 70°C.

Les réglages suivants ont été jugés appropriés lors de l'utilisation de la colonne spécifiée en (4.9.3) :

— débit pour la phase mobile (colonne) : 1,0 ml/min ;

— débit du réactif post-colonne : 0,3 ml/min ;

— volume injecté : 50 µl.

Laisser le système fonctionner pendant 10 min afin de le stabiliser. En cas d'utilisation d'un intégrateur, régler la sensibilité du détecteur de fluorescence ou de l'intégrateur afin d'obtenir un rapport signal/bruit de 5/1 pour 0,125 ng d'aflatoxine G_2 dans 50 µl.

En cas d'utilisation d'un enregistreur sur papier, régler la commande du détecteur de fluorescence afin d'obtenir une échelle de déplacement de 30 % à 40 % avec 0,125 ng d'aflatoxine G_2 dans 50 µl. Faire passer le deuxième filtrat (V_3) dans la colonne, laver cette dernière conformément aux instructions du constructeur et éliminer les éluats.

5.4 Identification

Identifier chaque pic d'aflatoxine du chromatogramme provenant de l'analyse de l'échantillon pour essai, en comparant les temps de rétention à ceux des étalons de référence correspondants.

5.5 Courbe d'étalonnage

Préparer la courbe d'étalonnage pour chaque aflatoxine en injectant 50 µl des solutions étalons 1, 2, 3 et 4 (tableau 2).

5.6 Dosage

La détermination quantitative se fait selon la méthode de l'étalonnage externe avec intégration de la surface du pic ou mesure de la hauteur du pic qui est ensuite comparée à la valeur correspondante de la substance étalon.

Injecter par volume de 50 µl le mélange étalon dans la boucle en suivant les instructions du fabricant de l'injecteur. L'élution des aflatoxines se fait dans l'ordre G_2, G_1, B_2, B_1, avec des temps de rétention respectifs d'environ 6 min, 8 min, 9 min et 11 min et il convient que les pics soient bien résolus. Le cas échéant, ajuster les temps de rétention en modifiant la concentration en méthanol du solvant de la phase mobile (3.11).

Injecter 50 µl (V_6) d'extrait d'échantillon purifié (5.2) dans la boucle d'injection.

6. CALCUL DES RESULTATS

Calculer la masse de l'échantillon pour essai mt , en grammes, présent dans la fraction du deuxième filtrat prélevé pour la colonne d'IAC (V_4) à l'aide de l'équation (2) ci–après :

$$m_t = m_o \frac{V_2 \times V_4}{V_1 \times V_3}$$

où :

m_o : est la masse de la prise d'essai (5.1), en grammes (m_o = 25 g) ;

V_1 : est le volume total du filtrat (5.1), en millilitres (V_1 = 125 ml) ;

V_2 : est le volume de la fraction du premier filtrat (5.1), en millilitres (V_2 = 15 ml) ;

V_3 : est le volume total du deuxième filtrat (5.1), en millilitres (V_3 = 45 ml) ;

V_4 : est le volume de la fraction du deuxième filtrat (5.2), en millilitres (V_4 = 15 ml) ;

Calculer la fraction massique de chaque aflatoxine, w_i , en microgrammes par kilogramme d'échantillon, à l'aide de l'équation (3) ci-après (méthode d'étalonnage externe) :

$$w_i = \frac{V_5 \times m_i}{V_6 \times m_t}$$

où :

V_5 est le volume de l'éluat (5.2), en microlitres (V_5 = 2000 µl) ;

V_6 est le volume de l'éluat injecté (5.6), en microlitres (V_6 = 50 µl) ;

m_i est la masse, en nanogrammes, de chaque aflatoxine ; i présente dans le volume d'injection, correspondant à la surface ou à la hauteur mesurée des pics relevée sur la courbe d'étalonnage ;

m_t est la masse de l'échantillon pour essai, en grammes, présent dans la fraction du deuxième filtrat prélevé pour la colonne d'IC (V_4) (selon l'équation 2).

Ajouter les fractions massiques des quatre aflatoxines pour obtenir la fraction massique de la somme des aflatoxines.

7. REPETABILITE

La différence absolue entre deux résultats d'essai unique sur un matériau d'essai identique, obtenus par un opérateur utilisant le même appareillage, dans l'intervalle de temps le plus court possible, ne dépassera pas la limite de répétitivité (r) dans plus de 5 % des cas.

8. REPRODUCTIBILITE

La différence absolue entre deux résultats d'essai unique et portant sur un matériau d'essai identique, entre deux laboratoires, ne dépassera pas la limite de reproductibilité (R) dans plus de 5 % des cas obtenus.

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 25 Dhou El Hidja 1432 correspondant au 21 novembre 2011 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en iode dans le sel alimentaire.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 10-149 du 14 Joumada Ethania 1431 correspondant au 28 mai 2010 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 90-40 du 30 janvier 1990 rendant obligatoire la vente du sel iodé pour la prévention de la carence en iode ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de la teneur en iode dans le sel alimentaire.

Art. 2. — Pour la détermination de la teneur en iode dans le sel alimentaire, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 25 Dhou El Hidja 1432 correspondant au 21 novembre 2011.

Mustapha BENDADA.

— — — — — — —

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE LA TENEUR EN IODE DANS LE SEL ALIMENTAIRE

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente méthode détermine le dosage de la teneur en iode dans le sel alimentaire.

2. DEFINITION

L'iodation du sel alimentaire se fait par addition d'iodate de potassium $KI0_3$. La teneur en iode du sel iodé est déterminée par une méthode volumétrique : l'iodométrie.

3. PRINCIPE

a) Par addition d'un acide et d'iodure de potassium (KI), l'iodate de potassium ($KI0_3$) contenu dans le sel est réduit en iode moléculaire (I_2). Cette quantité d'iode I_2 est équivalente à la quantité d'iodate dans le milieu (sel) ;

b) L'iode libéré est titré par une solution de thiosulfate de sodium standard ($Na_2S_20_3$).

L'amidon est utilisé comme indicateur de fin de titrage.

4. REACTIFS

— Réactifs purs pour analyser ;

— Eau distillée : laisser bouillir pendant 5 mn, la refroidir, la conserver dans des flacons bruns à l'abri de la lumière, de l'oxygène, de l'air et du froid.

Thiosulfate de sodium ($Na_2S_20_3,5H_20$, PM = 248,2)

— solution mère : 0,1 M ou 0,1 N ;

— solution de dosage: 0,002 M ou 0,002 N.

Iodate de potassium ($KI0_3$, PM = 214)

— solution étalon à 0,050 g/I.

Iodure de potassium (KI) à 10% (P/V)

.

Acide acétique glacial (CH_3COOH) ou acide sulfurique (H_2S0_4) 2N

Solution d'amidon à 0,25% (P/V).

4.1 Préparation des réactifs

Thiosolfate de sodium ($Na_2S_20_3$)

Solution mère : 0,1 M (ou O,1 N ou M/10 = N/10)

Dissoudre 24,82 g de $Na_2S_20_3,5H_20$ dans une fiole jaugée avec de l'eau distillée, compléter le volume à 1 litre.

Solution de dosage : (0,002 N ou N/500)

Pipeter 20 ml de la solution mère 0,1 N dans une fiole jaugée de 1000 ml, compléter le volume à 1000 ml.

Solution étalon de KI03 à 0,05 g/l

Solution mère de KI03 à 10 g/l : dissoudre 10 g de KI03 dans 1 litre d'eau distillée.

Solution de dosage : introduire 5 ml de solution mère dans une fiole jaugée de 1000 ml, compléter le volume à 1000 ml.

Solution de KI à 10 % : dissoudre 10 g de KI dans une fiole de 100 ml, compléter le volume à 100 ml.

Note : Cette solution doit être préparée au moment de l'emploi.

Solution d'amidon à 0,25% (P/V) : dissoudre 2,5 g d'amidon soluble dans 100 ml d'eau distillée, ajouter 900 ml d'eau distillée chaude, et 5 mg de HgI_2 ou de KCN.

— faire bouillir pendant 5 minutes ;

— ajouter 1 g d'acide salicylique ;

— refroidir, boucher.

Acide acétique glacial ou bien acide sulfirique 2 N.

Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire 80 ml d'eau distillée, y ajouter avec précaution 5,56 ml de H_2S0_4 (d = 1,83 à 96,3 %), compléter le volume avec de l'eau distillée à 100 ml.

4.2. Etalonnage de la solution de thiosulfate (0,002 M ou N/500)

Dans un erlenmeyer contenant environ 800 ml d'eau distillée :

— introduire 5 ml de la solution étalon de KI03 (à 0,05 g/l) ;

— ajouter 5 ml de solution de KI à 10 % et 5 ml d'acide acétique pur ;

— boucher et laisser reposer 5 minutes à l'obscurité ;

— titrer par la solution de $Na_2S_20_3$ (0,002N) jusqu'à obtention d'une couleur jaune pâle ;

— ajouter 5 ml de la solution d'amidon, on obtient une coloration bleue ;

— continuer à titrer par le thiosulfate jusqu'à la disparition de la couleur bleue, soit V = volume de $Na_2S_20_3$ utilisé et N = Normalité de la solution de $Na_2S_20_3$.

Calcul : N = 0,007/V.

5. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire.

6. ECHANTILLONNAGE

L'échantillonnage se fait selon les normes en vigueur.

7. MODE OPERATOIRE

— peser 10 ± 0,01 g de sel à tester, préalablement desséché au dessiccateur ;

— introduire le sel dans un erlenmeyer de 250 ml ;

— le dissoudre dans 100 ml d'eau distillée, bouillie et refroidie ;

— ajouter 1 ml d'acide acétique glacial ;

— ajouter 1 ml de KI à 10 %, on obtient une coloration jaune, boucher et laisser reposer pendant 5 minutes à l'obscurité ;

— titrer avec la solution de thiosulfate 0,002 m jusqu'à obtention d'une coloration jaune pâle ;

— ajouter alors 5 ml de solution d'amidon, on obtient une coloration bleue ;

— continuer à titrer avec la solution de thiosulfate jusqu'à la disparition de cette coloration bleue ;

— noter le volume de solution de thiosulfate nécessaire au dosage : (V_1) ;

— parallèlement faire un témoin dans les mêmes conditions, sur 100 ml d'eau distillée, bouillie et refroidie. noter le volume (V_2) ;

— doser chaque échantillon à deux reprises.

8. EXPRESSION DES RESULTATS

Calcul de la teneur en iode

Formule générale :

Iode (mg / kg sel) = (V_1 - V_2) x 4,232.

Iodate de potassium en (mg/kg sel) = (V_1 - V_2) x 7,1387

V_1 = Volume de Na_2S_203 nécessaire au titrage de l'iode dans le sel.

V_2 = Volume de $Na_2S_20_3$ nécessaire pour le témoin.

(Eq. mg) 1 = 127/6 = 21,16

(Eq. mg) ($KI0_3$) = 214/6 = 35, 66.

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 19 Joumada El Oula 1434 correspondant au 31 mars 2013 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en chlorures des produits dérivés des légumes.

— — — —

Le ministre du commerce;

Vu le décret présidentiel n°12-326 du 17 Chaoual 1433 correspondant au 4 septembre 2012 portant nomination des membres du gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu le décret exécutif n°l2-214 du 23 Joumada Ethania 1433 correspondant au 15 Mai 2012 fixant les conditions et les modalités d'utilisation des additifs alimentaires dans les denrées alimentaires destinées à la consommation humaine ;

Vu l'arrêté interministériel du 21 Rabie Ethani 1418 correspondant au 24 août 1997 relatif aux conserves de purée de tomates ;

Arrête :

Article ler. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détermination de la teneur en chlorures des produits dérivés des légumes.

Art. 2. — Pour la détermination de la teneur en chlorures des produits dérivés des légumes, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 19 Joumada El Oula 1434 correspondant au 31 mars 2013.

Mustapha BENBADA

— — — — — — — —

ANNEXE

Méthode de détermination de la teneur en chlorures des produits dérivés des légumes

La présente méthode spécifie une technique de détermination de la teneur en chlorures des produits dérivés des légumes.

Si les produits dérivés des légumes contiennent des pigments anthocyaniques naturels, la présente méthode de détermination de la teneur en chlorure est applicable moyennant certaines modifications spécifiées dans le point 7.

1. DÉFINITION

Teneur en chlorures des produits dérivés des légumes :

Totalité des chlorures, déterminés conformément à la méthode spécifiée, exprimés en pourcentage en masse de chlorure de sodium.

2. PRINCIPE

Précipitation des chlorures par addition d'un excès d'une solution titrée de nitrate d'argent et titrage de cet excès de nitrate d'argent avec une solution titrée de thiocyanate de potassium.

3. RÉACTIFS

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau de pureté au moins équivalente.

3.1 Nitrobenzène.

3.2 Acide nitrique, solution environ 4 N.

Mélanger 1 volume d'acide nitrique (P_{20} 1,39 à 1,42 g/ml) avec 3 volumes d'eau.

3.3 Nitrate d'argent, solution titrée O,1 N.

Sécher le nitrate d'argent (AgN $_{O}$3) durant 2 heures à 150 °C et le laisser refroidir dans un dessiccateur.

Dissoudre, dans de l'eau, 16,989 g du nitrate d'argent séché et compléter à 1000 ml dans une fiole jaugée.

3.4 Thiocyanate de potassium, solution titrée 0,1 N.

Dissoudre, dans de l'eau, 9,72 g de thiocyanate de potassium (KSCN) et compléter à 1000 ml dans une fiole jaugée.

Etalonner la solution obtenue avec la solution de nitrate d'argent (3.3), en présence de la solution de sulfate double d'ammonium et de fer (III) (3.5).

3.5 Sulfate double d'ammonium et de fer (III) [$(NH_4)_2$ SO_4, Fe $(S0_4)_3$, $24H_2O$],solution aqueuse saturée, acidifiée à l'aide d'acide nitrique (5ml d'acide nitrique,P_{20} 1,39 à 1,42 g/ml, pour100 ml de solution).

4. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

4.1 Homogénéisateur, ou **mortier** [pour le cas des produits épais, pâteux ou solides (5.1.3)].

4.2 Bécher, de 250 ml de capacité.

4.3 Fiole jaugée, de 250 ml de capacité.

4.4 Pipettes, permettant de délivrer respectivement 3,5,20 ml.

4.5 Fiole conique, de 200 ml de capacité.

4.6 Burettes, de 25 ml de capacité.

5. MODE OPERATOIRE

5.1 Préparation de l'échantillon pour essai

5.1.1 Produits contenant des phases solides et liquides distinctes

S'il existe une spécification, effectuer la détermination sur phase indiquée dans cette spécification.

S'il n'existe pas de spécification et dans le cas de produits récemment préparés, bien mélanger la totalité de l'échantillon pour laboratoire et effectuer la détermination sur l'échantillon homogénéisé.

5.1.2 Produits liquides

Bien mélanger l'échantillon pour laboratoire.

5.1.3 Produits épais, pâteux ou solides

Broyer l'échantillon pour laboratoire dans un homogénéisateur ou dans un mortier (4.1). Si nécessaire, découper le produit en petits morceaux avant le broyage. Bien mélanger l'échantillon pour laboratoire.

5.2 Prise d'essai

Peser, à 0,01 g près, environ 25 g de l'échantillon pour essai (5.1) dans le bécher de 250 ml (4.2).

5.3 Détermination

5.3.1 Préparation de la solution d'essai

Ajouter, à la prise d'essai (5.2), 100 ml d'eau chaude en mélangeant le contenu du bécher jusqu'à l'obtention d'une consistance homogène. porter le contenu du bécher à ébullition et l'y maintenir durant 1 min.

Refroidir, transvaser quantitativement le contenu du bécher dans la fiole jaugée de 250 ml (4.3) et compléter au trait repère avec de l'eau.

Mélanger soigneusement, laisser reposer durant, 15 min, puis filtrer sur un papier filtre plissé en recueillant le filtrat dans un récipient sec.

5.3.2 Titrage

Prélever, à l'aide d'une pipette (4.4), 20 ml du filtrat (5.3.1) et les introduire dans la fiole conique (4.5), ajouter 5 ml de la solution d'acide nitrique (3.2) et 5 ml de la solution de sulfate double d'ammonium et de fer (III) (3.5).

Verser, à l'aide d'une burette (4.6), un volume (V_1) de la solution de nitrate d'argent (3.3) suffisant pour obtenir, après la précipitation des chlorures, un excès de solution de nitrate d'argent compris entre 5 et 10 ml.

Ajouter 3 ml du nitrobenzène (3.1) et agiter vigoureusement le contenu de la fiole pour coaguler le précipité.

Note - L'usage du nitrobenzène exige des précautions spéciales, ce produit étant toxique.

Titrer l'excès de nitrate d'argent avec la solution de thiocyanate de potassium (3.4) jusqu'à l'obtention d'une couleur brun-rouge persistant durant 5 min.

Noter le volume (V_2) de la solution de thiocyanate de potassium utilisé.

5.3.3 Nombre de déterminations

Effectuer deux déterminations sur des prises d'essai provenant du même échantillon pour essai (5.1).

6. EXPRESSION DES RESULTATS

6.1 Mode de calcul et formule

La teneur en chlorures, exprimée en pourcentage en masse de chlorure de sodium, est donnée par la formule :

$$\frac{0{,}5845 \times (V_1 - V_2) \times V_3}{m \times V_4}$$

Où:

V_1 : est le volume, en millilitres, de la solution de nitrate d'argent (3.3) utilisé (5.3.2) ;

V_2 : est le volume, en millilitres, de la solution de thiocyanate de potassium (3.4) utilisé (5.3.2) ;

V_3 : est le volume, en millilitres, auquel a été porté le filtrat par dilution (5.3.1) ;

V_4 : est le volume, en millilitres de la partie aliquote du filtrat dilué, prélevée en vue du titrage (5.3.2) ;

m : est la masse, en grammes, de la prise d'essai (5.2).

Notes

1. Si le titre de la solution de thiocyanate de potassium n'est pas exactement O,lN, un facteur de correction approprié doit être appliqué à V_2 pour le calcul du résultat.

2. Si le mode opératoire spécifié en (5) a été scrupuleusement suivi, V_3 = 250 ml et V_4 =20 ml; la formule précédente est alors réduite à :

$$\frac{7{,}30625 \times (V_1 - V_2)}{m}$$

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des résultats des deux déterminations, si les conditions de répétabilité (6.2) sont remplies

Exprimer le résultat avec deux décimales.

6.2 Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations, effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre par le même analyste, sur le même échantillon pour essai, ne doit pas dépasser 0,05 g de chlorure de sodium pour 100 g de produit.

7. CAS PARTICULIER : Produits contenant des pigments anthocyaniques

Lorsque des pigments anthocyaniques sont présents, ceux-ci gênent le titrage, il est donc nécessaire de les éliminer par décomposition permanganique. La méthode doit alors être modifiée de la façon suivante :

7.1 Réactifs

Outre les réactifs spécifiés dans le point 3 :

7.1.1 Permanganate de potassium, solution saturée (environ 6,5 g de $KMn0_4$ pour 100 ml d'eau).

7.1.2 Nitrite de sodium, ou nitrite de potassium, cristallisé.

7.2 Mode opératoire

7.2.1 Opérer selon (5.1) à (5.3.1) inclus.

7.2.2 Prélever, à l'aide d'une pipette (4.4), 20 ml du filtrat (5.3.1) et les introduire dans la fiole conique (4.5). Ajouter environ 20 ml de la solution d'acide nitrique (3.2) et, à l'aide d'une pipette (4.4), exactement 20 ml (V 1) de la solution de nitrate d'argent (3.3).

Porter à ébullition et maintenir à douce ébullition durant 2 à 3 min.

Verser ensuite, par fractions de 0,5 à 1 ml, environ 5 à 10 ml de la solution de permanganate de potassium (7.1.1), en poursuivant l'ébullition douce. Le liquide doit devenir incolore ; sinon, ajouter quelques cristaux de nitrite de sodium ou de potassium (7.1.2) jusqu'à ce que la décoloration soit obtenue. Maintenir l'ébullition durant 5 min après que la décoloration de la solution aura été obtenue.

Refroidir, ajouter 5 ml de la solution de sulfate double d'ammonium et de fer (III) (3.5).

Poursuivre le mode opératoire comme décrit dans le 4e alinéa de (5.3.2). (L'addition de nitrobenzène n'est pas nécessaire).

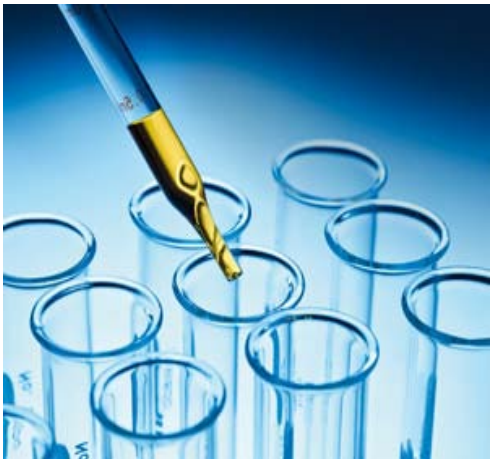
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DU COMMERCE

DIRECTION GÉNÉRALE DU CONTRÔLE ÉCONOMIQUE ET DE LA RÉPRESSION DES FRAUDES

Direction des Laboratoires d'Essais et d'Analyses de la Qualité

MÉTHODES OFFICIELLES D'ANALYSES RELATIVES À LA MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS (MÉTHODES HORIZONTALES)



Sommaire

1. Arrêté du 29 juillet 2012 rendant obligatoire la méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies. (JO n° 51- 2013)	**01**
2. Arrêté du 28 mai 2014 rendant obligatoire la méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique. (JO n° 38- 2014)	**04**
3. Arrêté du 21 mai 2014 rendant obligatoire la méthode de dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (staphylococcus aureus et autres espèces). (JO n° 68- 2014)	**07**
4. Arrêté du 31 juillet 2014 rendant obligatoire la méthode utilisant le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive. (JO n° 68- 2014)	**13**
5. Arrêté du 2 juin 2015 rendant obligatoire une méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures par cmptage des colonies dans les produits, dont l'activité d'eau est supérieure à 0,95. (JO n° 48- 2015)	**17**
6. Arrêté du 2 juin 2015 rendant obligatoire une méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures par cmptage des colonies dans les produits, dont l'activité d'eau est inférieure ou égale à 0,95. (JO n° 52- 2015)	**22**

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 10 Ramadhan 1433 correspondant au 29 juillet 2012 rendant obligatoire la méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 10-149 du 14 Joumada Ethania 1431 correspondant au 28 mai 2010 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05 - 465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article ler. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies.

Art. 2. — Pour le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 10 Ramadhan 1433 correspondant au 29 juillet 2012.

Mustapha BENBADA.

— — — — — — — —

ANNEXE

METHODE HORIZONTALE POUR LE DENOMBREMENT DES BACTERIES SULFITO-REDUCTRICES SE DEVELOPPANT EN CONDITIONS ANAEROBIES

La présente méthode spécifie une méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies. Elle est applicable aux :

— produits destinés à l'alimentation humaine et animale ;

— échantillons d'environnement dans le domaine de la production et de la distribution des aliments.

1. DÉFINITION

Pour les besoins de la présente méthode, la définition suivante s'applique.

1.1 Bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies

Bactéries formant des colonies dénombrables typiques dans les conditions spécifiées dans la présente méthode.

2. PRINCIPE

2.1 Ensemencement dans la masse de deux boîtes de Pétri (ou de deux tubes) de milieu au sulfite de fer avec une quantité spécifiée de l'échantillon pour essai si le produit initial est liquide, ou avec une quantité spécifiée de suspension mère dans le cas d'autres produits.

Préparation de deux autres boîtes (ou tubes) de gélose, dans les mêmes conditions, avec des dilutions décimales de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

2.2 Incubation en anaérobiose des boîtes (ou tubes) à 37 °C ± 1 °C pendant 24 h à 48 h (lecture finale au bout de 48 h), éventuellement à 50 °C si l'on suspecte la présence des bactéries thermophiles. Dénombrement de colonies caractéristiques de couleur noire. La couleur noire des colonies et des alentours est due à la formation du sulfure de fer (II) résultant de la réaction entre les ions sulfurés et les ions trivalents ferriques [Fe (III)] présents dans le milieu.

2.3 Calcul du nombre de bactéries sulfito-réductrices par millilitre ou par gramme d'échantillon, à partir du nombre de colonies obtenues sur les boites (ou tubes).

3. MILIEU DE CULTURE ET DILUANT

3.1 Gélose pour le dénombrement : gélose au sulfite de fer.

3.1.1 Composition

Digestat enzymatique de caséine	15 g
Digestat enzymatique de soja	5 g
Extrait de levure	5 g
Disulfite de sodium ($N_{a2}S_2O_5$)	1 g
Citrate de fer (III) ammoniacal	1 g
Agar-agar	9 g à 18 g[a]
Eau	1000 ml

[a] Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

3.1.2 Préparation

Dissoudre les ingrédients dans l'eau en chauffant. Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,6 ± 0,2 à 25 °C.

Verser des portions de 250 ml de milieu dans des flacons de 500 ml.

Si le dénombrement est effectué à l'aide de tubes (4.5), verser 20 ml à 25 ml de milieu dans les tubes. Stériliser à l'autoclave pendant 15 min à 121°C.

Désaérer le milieu juste avant son utilisation.

3.2 Diluant peptone - sel

4. APPARIELLAGE ET VERRERIE

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et, en particulier ce qui suit :

4.1 Matériel d'homogénéisation, pour les échantillons d'aliments solides.

4.2 Bain d'eau, pouvant être maintenu à une température comprise entre 44 °C et 47 °C.

4.3 Jarres pour anaérobiose, dotés d'un équipement permettant de générer une atmosphère anaérobie, et comprenant un système de vérification des conditions anaérobies.

4.4 Incubateur, pouvant être maintenu à 37 °C ± 1 °C et, si nécessaire, à 50 °C ± 1°C.

4.5 tubes à essais, de dimensions 16 mm x 160 mm, et fioles ou flacons de 500 ml de capacité.

5. ECHANTILLONNAGE

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon vraiment représentatif, non endommagé ni modifié lors du transport et de l'entreposage.

6. MODE OPERATOIRE POUR LA PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI

6.1 Généralités

Une représentation schématique du mode opératoire est donnée au tableau ci-dessous.

6.2 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Il peut être nécessaire d'effectuer un traitement thermique de la suspension mère pour éliminer les formes végétatives de bactéries formant des spores et/ou les bactéries non sporulées. Les températures et les temps de chauffage varient selon les besoins, allant de combinaisons produisant un effet de pasteurisation marqué à un effet d'activation des spores par la chaleur (par exemple 75 °C pendant 20 min) à une ébullition de plusieurs minutes. Dans ce cas, le résultat peut être donné en nombre de spores de bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies.

6.3 Ensemencement

Prendre deux boîtes de Petri stériles. A l'aide d'une pipette stérile, transférer dans chaque boîte 1 ml d'échantillon pour essai si le produit à tester est liquide, ou 1 ml de suspension mère pour les autres produits.

Prendre deux autres boîtes de Petri stériles. A l'aide d'une nouvelle pipette stérile, transférer 1 ml de la première dilution décimale (10^{-1}) de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1 ml de la deuxième dilution décimale (10^{-2}) de la suspension mère pour les autres produits.

Répéter la procédure décrite avec les dilutions suivantes, en utilisant une nouvelle pipette stérile pour chaque dilution.

Ajouter dans chacune des boîtes de Petri environ 15 ml de gélose au sulfite de fer (3.1) refroidi à l'aide d'un bain d'eau (4.2) à une température comprise entre 44°C et 47°C. Il convient que le temps écoulé entre l'ensemencement des boîtes de Petri et l'addition du milieu gélosé n'excède pas 15 min. Bien mélanger l'inoculum avec le milieu gélosé à l'aide de mouvements horizontaux, puis laisser le milieu se solidifier.

Après solidification du milieu, verser dans la boîte 5 ml à 10 ml du même milieu, de manière à recouvrir la couche précédente.

Dans le cas où des tubes sont utilisés, inoculer 1 ml de chacune des dilutions dans chacun de deux tubes contenant le milieu gélosé, conservés à une température comprise entre 44 °C et 47 °C. Mélanger délicatement en évitant la formation de bulles d'air, puis laisser le milieu se solidifier à l'aide d'un bain d'eau (4.2).

Après solidification du milieu, verser dans chaque tube 2 ml à 3 ml du même milieu, de manière à recouvrir la couche précédente.

6.4 Incubation

Après solidification, incuber les boîtes de Petri dans des jarres pour anaérobiose (4.3) à 37°C ± 10°C pendant 24 h à 48 h.

Si l'on suspecte la présence de bactéries thermophiles, préparer une deuxième série de boîtes de Pétri (voir 6.3). Incuber ces boîtes à 50 °C ± 1 °C.

Si des tubes sont utilisés, l'incubation dans des jarres pour anaérobiose n'est pas nécessaire.

6.5 Comptage des colonies

Lire les résultats après 24 h et après 48 h, selon le degré de coloration noire et le taux de croissance des micro-organismes. Les colonies noires, éventuellement entourées d'une zone noire, sont dénombrées comme des bactéries sufito-réductrices.

Note 1 — Il peut se produire un noircissement diffus et non spécifique du milieu, surtout lorsque l'inoculation est effectuée dans des tubes de gélose au lieu de boîtes de Pétri. La croissance des bactéries anaérobies, qui produisent seulement de l'hydrogène (pas de H_2S), peut également réduire le sulfite présent et provoquer un noircissement général du milieu.

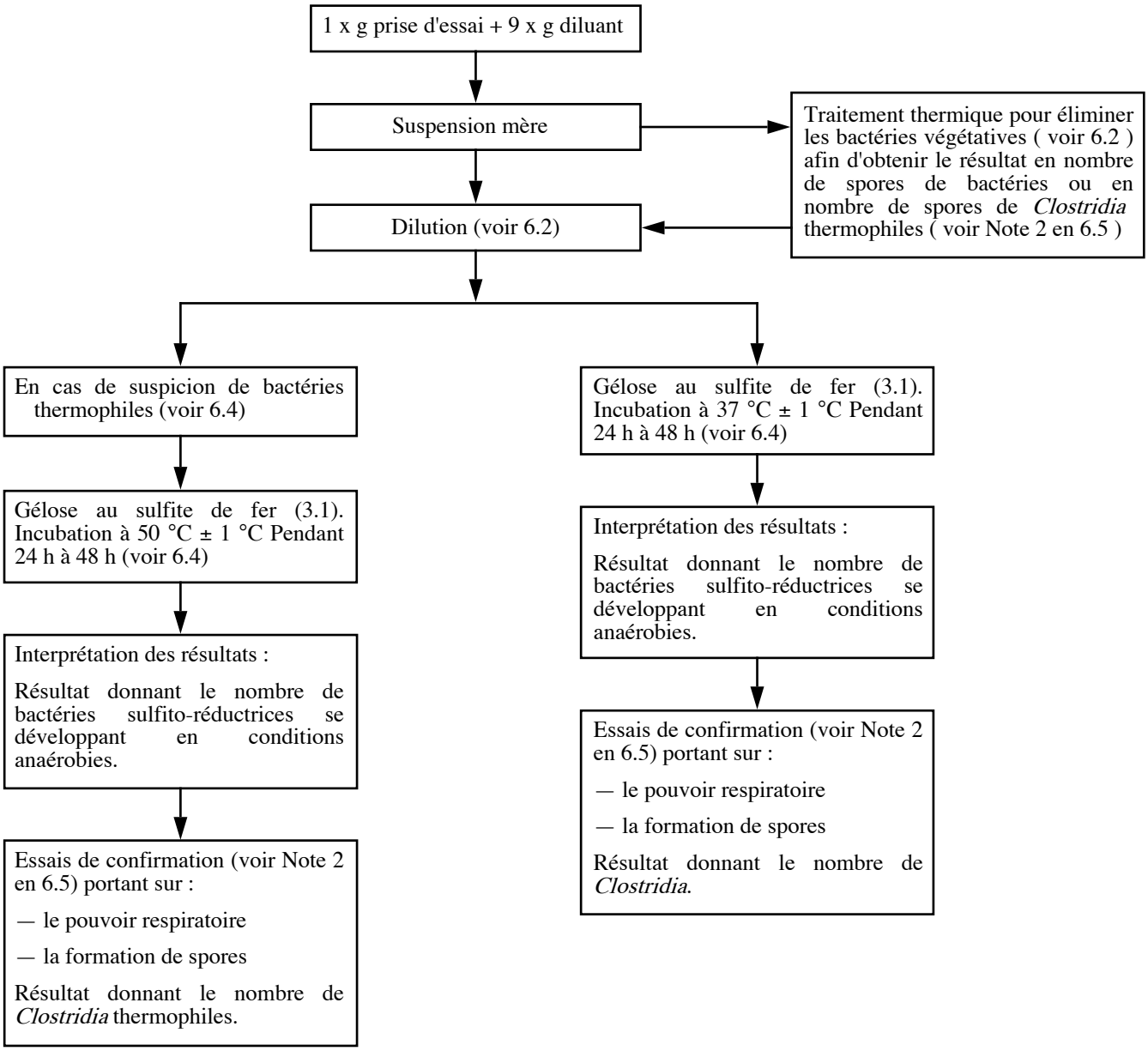
Dénombrer les colonies sulfito-réductrices dans chaque boite contenant moins de 150 colonies caractéristiques et moins de 300 colonies au total.

Il est possible que les nombres spécifiés ci -dessus soient trop élevés pour les tubes; dans ce cas ne tenir compte que des tubes dans lesquels les colonies sont bien séparées.

Note 2 — La présente méthode se prête également au dénombrement des seules *Clostridia*. Dans ce cas, après avoir obtenu des colonies caractéristiques, prélever cinq d'entre elles dans chaque boite utilisée, puis confirmer le genre *Clostridium* au moyen d'essais de confirmation (par exemple essais portant sur le pouvoir respiratoire, sur la formation de spores).

Tableau

représentation schématique du mode opératoire


1 x g prise d'essai + 9 x g diluant
Suspension mère
Traitement thermique pour éliminer les bactéries végétatives (voir 6.2) afin d'obtenir le résultat en nombre de spores de bactéries ou en nombre de spores de Clostridia thermophiles (voir Note 2 en 6.5)
Dilution (voir 6.2)
En cas de suspicion de bactéries thermophiles (voir 6.4)
Gélose au sulfite de fer (3.1). Incubation à 50 °C ± 1 °C Pendant 24 h à 48 h (voir 6.4)
Interprétation des résultats :
Résultat donnant le nombre de bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies.
Essais de confirmation (voir Note 2 en 6.5) portant sur :
— le pouvoir respiratoire
— la formation de spores
Résultat donnant le nombre de Clostridia thermophiles.
Gélose au sulfite de fer (3.1). Incubation à 37 °C ± 1 °C Pendant 24 h à 48 h (voir 6.4)
Interprétation des résultats :
Résultat donnant le nombre de bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies.
Essais de confirmation (voir Note 2 en 6.5) portant sur :
— le pouvoir respiratoire
— la formation de spores
Résultat donnant le nombre de Clostridia.

Arrêté du 28 Rajab 1435 correspondant au 28 mai 2014 rendant obligatoire la méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.

———

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 14-154 du 5 Rajab 1435 correspondant au 5 mai 2014 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05- 465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.

Art. 2. — Pour la préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet, doivent employer la méthode jointe en annexe.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alge, le 28 Rajab 1435 correspondant au 28 mai 2014.

Amara BENYOUNES.

———————

ANNEXE

METHODE DE PREPARATION DES ECHANTILLONS, DE LA SUSPENSION MERE ET DES DILUTIONS DECIMALES EN VUE DE L'EXAMEN MICROBIOLOGIQUE

La présente méthode définit les règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales réalisées en aérobiose, en vue des examens microbiologiques des produits destinés à la consommation humaines ou à l'alimentation animale.

I. TERMES ET DEFINITIONS

Pour les besoins de la présente méthode les termes et les définitions suivantes s'appliquent :

1.1 suspension mère (première dilution)

Suspension, solution ou émulsion obtenue après qu'une quantité pesée ou mesurée du produit à analyser (ou de l'échantillon pour essai préparé à partir de ce produit) a été mélangée avec une quantité neuf fois égale de diluant, en laissant se déposer les particules grossières, s'il y en existe. (3 et les notes 1 et 2 en 6.1)

1.2 Dilutions décimales suivantes

Suspensions ou solutions obtenues en mélangeant un volume mesuré de la suspension mère (1.1) avec un volume neuf fois égal de diluant et en répétant cette opération sur les dilutions suivantes, jusqu'à obtention d'une gamme de dilutions décimales appropriée pour l'inoculation des milieux de culture.

2. PRINCIPE

Préparation de la suspension mère (1.1), de façon à obtenir une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes contenus dans la prise s'essai.

Préparation, si nécessaire, de dilutions décimales (1.2) en vue de réduire le nombre de microorganismes par unité de volume pour permettre, après incubation, d'observer leur éventuel développement (cas des tubes) ou d'effectuer le dénombrement des colonies (cas des boîtes), comme précisé dans chaque méthode spécifique.

NOTE - Pour restreindre le domaine de dénombrement à un intervalle donné ou si des nombres élevés de micro-organismes sont attendus, il est possible d'ensemencer uniquement les dilutions décimales nécessaires (deux dilutions successives au minimum).

3. DILUANTS

3.1 Composants de base

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation du diluant, des composants de base déshydratés ou une préparation complète déshydratée. les instructions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques doivent être de qualité analytique reconnue et appropriée pour l'analyse microbiologique.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de qualité équivalente.

3.2 Diluants d'emploi général

3.2.1 Solution de peptone - sel

3.2.1.1 Composition

Digestat enzymatique de caséine ..... 1 g

Chlorure de sodium (NaCl) ..... 8,5 g

Eau ..... 1000 ml

3.2.1.2 Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7 ± 0,2 à 25 °C.

3.2.2 Eau peptonée tamponnée

3.2.2.1 Composition

Digestat enzymatique de tissus animaux ..... 10 g

Chlorure de sodium (NaCl) ..... 5 g

Hydrogénophosphate disodique dodécahydraté (Na_2HPO_4, 12 H_2O) ..... 9 g

Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) .. 1,5 g

Eau ..... 1000 ml

3.2.2.2 Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7 ± 0,2 à 25 °C.

3.3 Répartition et stérilisation du diluant

Répartir le diluant (3.2) en volumes nécessaires à la préparation des suspensions mères dans des fioles (4.4) de capacité appropriée.

Répartir le diluant (3.2) en volumes nécessaires à la préparation des dilutions décimales dans des tubes à essai (4.5) ou fioles (4.4) en quantité telle qu'après stérilisation, chaque tube ou fiole contienne 9 ml. L'incertitude de mesure de ce volume final, après stérilisation, ne doit pas excéder ± 2 %

Note : S'il est prévu de dénombrer plusieurs groupes de micro-organismes au moyen de milieux de culture différents, il peut être nécessaire de répartir tous les diluants (ou quelques-uns seulement) en quantités supérieures à 9 ml, la dimension des fioles (4.4) et des tubes à essai (4.5) étant prévue en conséquence.

Boucher les tubes ou les fioles.

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 min.

4 - APPAREILLAGE ET VERRERIE

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et, en particulier, ce qui suit.

4.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) et en chaleur humide (autoclave).

4.2 Appareillage pour homogénéisation.

4.3 Agitateur mécanique.

4.4 Fioles, de capacités appropriées.

4.5 Tubes à essai, de capacités appropriées

4.6 Pipettes graduées à écoulement total, de 1 ml et 10 ml de capacité nominale, graduées respectivement en 0,1 ml et 0,5 ml.

4.7 pH - mètre, ayant une précision de lecture de ± 0,1 unité pH à 25 °C, permettant de réaliser des mesures précises à ± 0,1 unité pH.

4.8 Balance, capable de peser à 0,01 g près.

5. ECHANTILLONNAGE

L'échantillonnage se fait dans des conditions appropriées.

6. MODE OPERATOIRE

6.1 prise d'essai et suspension mère (Première dilution)

Dans un bol ou dans un sac en plastique stériles, peser, avec une incertitude de mesure de ± 5 %, une masse m (g), ou mesurer, avec une incertitude de mesure de ± 5 %, un volume v (ml) (au minimum 10 g ou 10 ml, sauf spécification contraire) représentatifs de l'échantillon pour essai.

Ajouter une quantité de diluant égale à 9 x m (g) ou 9 x v (ml). Cette quantité peut être mesurée de préférence en masse, avec une incertitude de mesure de ± 5%, ou en volume, avec une incertitude de mesure de ± 5 %.

Note 1 : Il peut être nécessaire dans certains cas, notamment pour les produits donnant une suspension mère 1 + 9 trop visqueuse ou trop épaisse, d'ajouter davantage de diluant. 11 convient alors d'en tenir compte dans la suite des opérations et / ou dans l'expression des résultats.

Note 2 : Cette première dilution conditionne en partie la valeur de la limite inférieure de dénombrement, qui dépend également de la technique utilisée (par exemple ensemencement dans la masse avec un inoculum de 1 ml dans une suspension 1/10, pour laquelle cette limite est de 10 micro-organismes par gramme). S'il est nécessaire, pour certains dénombrements dans certains produits, de descendre en dessous de cette limite, il est possible d'utiliser un volume inférieur de diluant. I1 convient de noter que l'ensemencement de cette suspension, mère peut éventuellement entrainer des difficultés liées au déséquilibre du rapport inoculum / milieu (inhibition de la croissance microbienne par concentration accrue des composants de l'aliment).

Pour éviter d'endommager les micro-organismes par de brusques changements de température, la température du diluant pendant les opérations décrites ci-après, doit être proche de la température ambiante, sauf produits particuliers.

Homogénéiser le mélange.

Si nécessaire , laisser les grosses particules se déposer durant 15 min au maximum. Les systèmes de filtration donnant des résultats équivalents peuvent être utilisés.

Dans le cas du dénombrement des spores, un chauffage de la suspension mère (par exemple pendant 10 min à 80°C) doit être pratiqué immédiatement après sa préparation, suivi d'un refroidissement rapide.

6.2 Dilutions décimales suivantes

Transvaser, à l'aide d'une pipette stérile (4.6) et avec une incertitude de mesure de ± 5%, 1 ml de la suspension mère dans un tube contenant 9 ml de diluant à la température appropriée.

Note : Si un plus grand volume est nécessaire, il est possible d'ajouter un volume déterminé de suspension mère (plus 1 ml), avec une incertitude de mesure de ± 5%, dans une fiole (4.4) contenant neuf fois le volume de diluant stérile.

Pour une précision optimale, ne pas introduire la pipette dans la suspension mère de plus de 1 cm.

Eviter tout contact entre la pipette (4.6) contenant l'inoculum et le diluant stérile.

Mélanger soigneusement la prise d'essai et le diluant, en utilisant de préférence un agitateur mécanique (4.3) pendant 5 s à 10 s, pour obtenir la dilution 10^{-2}.

Si nécessaire, répéter ces opérations sur la dilution 10^{-2} et les dilutions décimales suivantes en utilisant à chaque dilution une nouvelle pipette stérile afin d'obtenir les dilutions 10^{-3}, 10^{-4}, etc... jusqu'à obtention du nombre approprié de micro-organismes.

6.3 Durée des opérations

Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la suspension mère et le moment où l'inoculum entre en contact avec le milieu de culture ne doit pas dépasser 45 min, en limitant à 30 min le temps séparant la préparation de la suspension mère (6.1) du début de la préparation des dilutions décimales suivantes.

Note : Si la température ambiante du laboratoire est trop élevée, il convient de réduire ces deux durées maximales.

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 21 Rajab 1435 correspondant au 21 mai 2014 rendant obligatoire la méthode de dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*staphylococcus aureus* et autres espèces).

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 14-154 du 5 Rajab 1435 correspondant au 5 mai 2014 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou El Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de dénombrement des staphylocoques à coagulase positive.

Art. 2. — Pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 21 Rajab 1435 correspondant au 21 mai 2014.

Amara BENOUNES.

— — — — — — — —

ANNEXE

Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces)

(Technique utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker et inclusion des données de fidélité)

La présente méthode spécifie une technique horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive dans les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale, par comptage des colonies obtenues sur milieu solide (milieu de Baird-Parker) après incubation en aérobiose à 35° C ou 37° C.

1 - Termes et définitions :

Pour les besoins de la présente méthode, les termes et définitions suivants s'appliquent :

1.1 - Staphylocoques à coagulase positive,

Bactéries formant des colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques à la surface d'un milieu de culture sélectif et donnant une réaction positive à la coagulase. lorsque l'essai est effectué selon la présente méthode.

1.2 - Dénombrement des staphylocoques à coagulase positive, détermination du nombre de staphylocoques à coagulase positive trouvé par millilitre ou par gramme d'échantillon, lorsque l'essai est effectué selon la présente méthode.

2 - Principe :

2.1 - Ensemencement en surface d'un milieu gélosé sélectif coulé dans deux séries de boîtes, avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Dans les mêmes conditions, ensemencement des dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère, à raison de deux boîtes par dilution.

2.2 - Incubation de ces boîtes à 35° C ou à 37° C (la température est indiquée dans le bulletin d'analyse) en aérobiose et examen après 24 h et 48 h.

2.3 - Calcul du nombre de staphylocoques à coagulase positive par millilitre ou par gramme d'échantillon, à partir du nombre de colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques obtenues dans les boîtes retenues aux niveaux de dilution donnant un résultat significatif, et confirmées par un résultat positif de l'essai de la coagulase.

3 - Diluant et milieux de culture :

3.1 - Diluant

Voir la méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales.

3.2 - Milieu gélosé de Baird-Parker (le milieu gélosé est celui de Baird - Parker avec addition de sulfamézathine dans le cas où l'on suspecte la présence de *Proteus*).

NOTE : des milieux commercialisés peuvent être utilisés. Dans ce cas. il convient de se conformer strictement aux prescriptions du fabricant.

3.2.1 - Milieu de base :

3.2.1.1 - Composition :

Digestat pancréatique de caséine..... 10 g

Extrait de levure..... 1 g

Extrait de viande..... 5 g

Pyruvate de sodium..... 10 g

L-Glycine..... 12 g

Chlorure de lithium..... 5 g

Agar-agar..... 12 g à 22 g a)

Eau, pour obtenir un volume final de 1000 ml.

a) (Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar).

3.2.1.2 - Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en portant à ébullition.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,2 ± 0,2 à 25° C.

Répartir le milieu, par quantités de 100 ml, dans des flacons ou fioles (4.5) de capacité appropriée.

Stériliser le milieu à 121°C pendant 15 min.

3.2.2 - Solutions :

3.2.2.1 - Solution de tellurite de potassium :

3.2.2.1.1 - Composition :

Tellurite de potassium [a] ($K_2 T_e 0_3$) ..... 1 g

Eau..... 100 ml.

a : Il est recommandé de s'assurer au préalable que le tellurite de potassium dont on dispose convient pour cet essai (3.2.2.1.2).

3.2.2.1.2 - Préparation :

Dissoudre complètement le tellurite de potassium dans l'eau, en chauffant le moins possible.

Il convient que la poudre soit rapidement soluble. Si un composé blanc insoluble est présent dans l'eau, ne pas retenir la poudre.

Stériliser par filtration sur des membranes de 0,22 µm de porosité.

La solution peut être conservée au maximum 1 mois à +3° C ± 2° C.

Eliminer la solution si un précipité blanc se forme.

3.2.2.2 - Emulsion de jaune d'œuf (à une concentration d'environ 20 % ou selon les instructions du fabricant).

NOTE : Si une préparation commerciale est disponible, il convient de l'utiliser.

Utiliser des œufs frais de poule à coquille intacte. Nettoyer les œufs avec une brosse à l'aide d'un détergent liquide.

Les rincer à l'eau courante puis désinfecter les coquilles, soit en les plongeant dans l'éthanol à 70 % (fraction volumique) pendant 30 s et les laissant sécher à l'air, soit en les pulvérisant d'alcool suivi de flambage.

En opérant de façon aseptique, casser chaque oeuf et séparer le jaune du blanc par transferts répétés du jaune d'une demi-coquille dans l'autre. Placer les jaunes dans un flacon stérile (4.5) et ajouter quatre fois leur volume d'eau stérile. Mélanger vigoureusement. Chauffer le mélange dans le bain d'eau (4.4) réglé à 47° C pendant 2 h et entreposer à +3° C ± 2° C pendant 18 h à 24 h pour laisser se former un précipité. Recueillir aseptiquement le liquide surnageant dans un flacon récemment stérilisé pour l'utilisation.

L'émulsion peut être conservée 72 h au maximum à + 3° C ± 2° C.

3.2.2.3 - Solution de sulfamézathine (sulfaméthazine, sulfadimidine) :

NOTE : A être utilisée seulement dans le cas où l'on suspecte la présence d'espèces de *Proteus* dans l'échantillon pour essai.

3.2.2.3.1 - Composition :

Sulfamézathine..... 0,2 g

Solution d'hydroxyde de sodium, c(NaOH) à 0,1 mol/l..... 10 ml

Eau..... 90 ml

3.2.2.3.2 - Préparation :

Dissoudre la sulfamézathine dans la solution d'hydroxyde de sodium.

Compléter à 100 ml avec de l'eau.

Stériliser par filtration sur des membranes de 0,22 µm de porosité.

La solution peut être conservée au maximum 1 mois à + 3° C ± 2° C.

3.2.3 - Milieu complet :

3.2.3.1 - Composition :

Milieu de base (3.2.1)..... 100 ml

Solution de tellurite de potassium..... (3.2.2.1) 1 ml

Emulsion de jaune d'œuf (3.2.2.2)..... 5 ml

Solution de sulfamézathine (3.2.2.3) (si nécessaire)

..... 2,5 ml

3.2.3.2 - Préparation :

Faire fondre le milieu de base, puis le refroidir à environ 47° C au moyen du bain d'eau (4.4).

Ajouter, de façon aseptique, les deux autres solutions (3.2.2.1 et 3.2.2.2) et, si nécessaire (si l'on suspecte la présence d'espèces de *Proteus* dans l'échantillon pour essai), la solution de sulfamézathine (3.2.2.3), chaque solution étant préalablement réchauffée au bain d'eau à 47 °C, en mélangeant soigneusement après chaque addition.

3.2.4 - Préparation des boîtes de milieu gélosé :

Couler la quantité nécessaire du milieu complet (3.2.3), dans des boîtes de Petri stériles de façon à obtenir une épaisseur de gélose d'environ 4 mm, et laisser se solidifier.

Les boîtes peuvent être conservées, avant séchage, 24 h au maximum à +3° C ± 2° C.

NOTE : pour la durée de conservation de boîtes préparées industriellement, il convient de suivre les instructions du fabricant.

Avant utilisation, sécher les boîtes, de préférence avec le couvercle enlevé, et avec la surface de la gélose tournée vers le bas, dans une étuve réglée entre 25° C et 50° C, jusqu'à disparition des gouttelettes à la surface du milieu.

3.3 - Bouillon cuœr-cervelle :

3.3.1 - Composition :

Digestat enzymatique de tissus animaux..... 10 g

Extrait déshydraté de cervelle de veau..... 12,5 g

Extrait déshydraté de coeur de bœuf..... 5 g

Glucose..... 2 g

Chlorure de sodium..... 5 g

Hydrogénorthophosphate disodique anhydre

(Na_2HP0_4)..... 2,5 g

Eau..... 1000 ml

3.3.2 - Préparation :

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,4 ± 0,2 à 25° C.

Répartir le milieu de culture, par quantités de 5 ml à 10 ml, dans des tubes ou fioles (4.5) de capacité appropriée.

Stériliser le milieu à 121° C pendant 15 min.

3.4 - Plasma de lapin :

Utiliser un plasma déshydraté de lapin, disponible dans le commerce, et le réhydrater en se conformant aux instructions du fabricant.

Si l'on ne peut se procurer du plasma de lapin déshydraté, diluer un plasma de lapin frais et stérile à 1 volume pour 3 volumes d'eau stérile.

Si du citrate de potassium ou du citrate de sodium a été utilisé comme anticoagulant du plasma, ajouter une solution d'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) de manière à avoir 0,1 % d'EDTA dans le plasma réhydraté ou dilué (le plasma oxalaté ou hépariné ne demande pas d'EDTA).

A défaut d'instructions du fabricant, le plasma réhydraté ou dilué doit être utilisé extemporanément.

Avant utilisation, contrôler chaque lot de plasma avec des souches de staphylocoques à coagulase positive ainsi qu'avec des souches de staphylocoques à coagulase négative.

4 - Appareillage et verrerie :

NOTE : Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, à condition que ses spécifications soient convenables.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et en particulier, ce qui suit.

4.1 - Appareil pour la stérilisation en chaleur sèche (four) et en chaleur humide (autoclave).

4.2 - Etuve, permettant de maintenir les milieux inoculés, les boîtes et les flacons à l'intérieur d'une plage de températures de 35° C ± 1° C ou 37° C ± 1° C.

4.3 - Enceinte de séchage ou **étuve,** pouvant être maintenue à une température entre 25° C ± 1° C et 50° C ± 1° C.

4.4 - Bain d'eau, ou dispositif similaire, réglable à 47° C ± 2° C.

4.5 - Tubes à essai, flacons ou **fioles avec des bouchons à vis,** de capacités appropriées, pour la stérilisation et la conservation des milieux de culture et l'incubation des milieux liquides ; en particulier, tubes stériles à hémolyse, ou flacons à fond rond de dimensions 10 mm, 75 mm, environ.

4.6 - Boîtes de Pétri, stériles, en verre ou en matière plastique.

4.7 - Fil droit, et pipette Pasteur.

4.8 - Pipettes graduées à écoulement total, de 1 ml, 2 ml et 10 ml de capacité nominale, graduées respectivement en 0,1 ml et 0,5 ml.

4.9 - Étaleurs, stériles, en verre ou en matière plastique.

4.10 - pH-mètre, ayant une précision de lecture de ± 0,01 unité pH à 25° C, permettant de réaliser des mesures précises à ± 0,1 unité pH.

5 - Echantillonnage

L'échantillonnage et la préparation des échantillons doivent être effectués dans des conditions appropriées.

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

6 - Mode opératoire :

6.1 - Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Voir la méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique-Règles générales pour la préparation de suspension mère et des dilutions décimales.

6.2 - Ensemencement

6.2.1 - Transférer, à l'aide d'une pipette stérile (4.8), 0,1 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide ou 0,1 ml de suspension mère (dilution 10^{-1}) pour les autres produits, à la surface de chacune des deux boîtes de milieu gélosé (3.2.4).

Répéter l'opération avec la dilution 10^{-2} et les dilutions suivantes si nécessaire.

6.2.2 - S'il est nécessaire, pour certains produits, de procéder à l'estimation de petits nombres de staphylocoques à coagulase positive, les limites du dénombrement peuvent être augmentées d'une puissance de 10 en ensemençant 1 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide, ou 1 ml de la suspension mère pour les autres produits, soit à la surface d'une grande boîte (140 mm) de milieu gélosé, soit à la surface de trois (3) petites boîtes (90 mm) de milieu gélosé. Dans les deux cas, effectuer ces opérations en double, de façon à avoir deux grandes boîtes ou six petites boîtes.

6.2.3 - Etaler soigneusement l'inoculum le plus rapidement possible à la surface du milieu gélosé en évitant de toucher les bords de la boîte avec l'étaleur (4.9). Laisser sécher les boîtes, avec leur couvercle en place, pendant, environ, 15 min à la température ambiante.

6.3 - Incubation :

Retourner les boîtes préparées selon 6.2.3, les incuber pendant 24 h ± 2 h, puis les réincuber pendant 24 h ± 2 h supplémentaires dans l'étuve (4.2) à 35° C ou à 37° C. (la température est indiquée dans le bulletin d'analyse).

6.4 - Sélection des boîtes et interprétation

6.4.1 - Après 24 h ± 2 h d'incubation, marquer sur le fond des boîtes les positions des colonies caractéristiques éventuellement présentes (note 1).

Incuber à nouveau toutes les boîtes à 35° C ou à 37° C (la température est indiquée dans le bulletin d'analyse) durant 24 h ± 2 h supplémentaires, et marquer les nouvelles colonies caractéristiques. Marquer également les colonies non caractéristiques éventuellement présentes (note 2).

Ne retenir pour le dénombrement que les boîtes renfermant au maximum 300 colonies dont 150 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques au niveau de deux dilutions successives. Il faut qu'une des boîtes renferme au moins 15 colonies.

Choisir, en vue de la confirmation (6.5), un nombre déterminé *A* (en général 5 colonies caractéristiques s'il n'y a que des colonies caractéristiques, ou 5 colonies non caractéristiques s'il n'y a que des colonies non caractéristiques, ou 5 colonies caractéristiques et 5 colonies non caractéristiques si les deux types sont présents, à partir de chaque boîte).

S'il y a moins de 15 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques sur les boîtes ensemencées avec un produit liquide non dilué ou avec la dilution la plus faible pour les autres produits, il est possible de faire une estimation comme décrit en (6.4.3) et en (7.2).

NOTE 1 : Les colonies caractéristiques sont noires ou grises, brillantes et convexes (l mm à 1,5 mm de diamètre après 24 h d'incubation et 1,5 mm à 2,5 mm de diamètre après 48 h d'incubation) et sont entourées d'une auréole claire qui peut être partiellement opaque. : Après, au moins, 24 h d'incubation, un anneau opalescent peut apparaître dans cette zone claire immédiatement au contact des colonies.

NOTE 2 :

Les colonies non caractéristiques ont la même taille que les colonies caractéristiques et peuvent présenter l'une des morphologies suivantes :

— colonies noires et brillantes avec ou sans bord blanc étroit; la zone claire et l'anneau opalescent sont absents ou à peine visibles ;

— colonies grises dépourvues de zone claire.

Les colonies non caractéristiques sont surtout formées de souches de staphylocoques à coagulase positive contaminant, par exemple, les produits laitiers, les crevettes et les abats. Ce sont moins souvent des souches de staphylocoques à coagulase positive qui contaminent les autres produits.

NOTE 3 : Les **autres colonies** sont celles éventuellement présentes sur les boîtes et qui n'ont pas l'apparence décrite dans les notes 1 et 2 pour les colonies caractéristiques et non caractéristiques. Ces colonies sont considérées comme faisant partie de la flore annexe.

6.4.2 - Si 1 ml d'inoculum a été réparti sur trois boîtes (7.2.2), effectuer les opérations de dénombrement et de confirmation sur l'ensemble de ces boîtes comme s'il s'agissait d'une seule boîte.

6.4.3 - Pour faire une estimation de petits nombres de staphylocoques à coagulase positive, retenir toutes les boîtes qui contiennent des colonies caractéristiques et non caractéristiques. Retenir toutes ces colonies en vue de la confirmation sans sortir des limites fixées ci-dessus.

6.5 - Confirmation (recherche de la coagulase)

À l'aide d'un fil stérile (4.7), prélever une partie de chaque colonie sélectionnée (6.4) et l'ensemencer dans un tube ou dans un flacon de bouillon cœur-cervelle (3.3).

Incuber à 35° C ou 37° C (la température est indiquée dans le bulletin d'analyse) pendant 24 h ± 2 h.

Ajouter aseptiquement 0,1 ml de chaque culture à 0,3 ml de plasma de lapin (3.4) (à moins que d'autres quantités soient spécifiées par le fabricant) dans des tubes stériles à hémolyse ou flacons (spécifiés en 4.5) et incuber à 35° C ou à 37° C (la température est indiquée dans le bulletin d'analyse).

En inclinant le tube, examiner la coagulation du plasma après 4 h à 6 h d'incubation et, si le test est négatif, réexaminer après 24 h d'incubation, ou examiner après les temps d'incubation préconisés par le fabricant.

Considérer que la réaction à la coagulase est positive quand le coagulum occupe plus de la moitié du volume initialement occupé par le liquide.

A titre de contrôle négatif, ajouter, pour chaque lot de plasma, 0,1 ml de bouillon cœur - cervelle stérile (3.3) à la quantité recommandée de plasma de lapin (3.4) et faire incuber sans ensemencement. Pour que la réaction soit valable, le plasma du tube témoin ne devra pas montrer de signes de coagulation.

7 - Expression des résultats

7.1 - Cas général

7.1.1 - Calcul du nombre α de staphylocoques à coagulase positive identifiés pour chaque boîte retenue :

Calculer, pour chacune des boîtes, le nombre α de staphylocoques à coagulase positive identifiés, selon l'équation suivante :

$$\alpha = \frac{b_c}{A_c} \times C_c + \frac{b_{nc}}{A_{nc}} \times C_{nc}$$

Où

A_c : Nombre de colonies caractéristiques soumises au test de la coagulase (6.5) ;

A_{nc} : Nombre de colonies non caractéristiques soumises au test de la coagulase (6.5) ;

b_c : Nombre de colonies caractéristiques qui ont répondu positivement au test de la coagulase ;

b_{nc} : Nombre de colonies non caractéristiques qui ont répondu positivement au test de la coagulase ;

C_c : Nombre total de colonies caractéristiques repérées sur la boîte (6.4) ;

C_{nc} : Nombre total de colonies non caractéristiques repérées sur la boîte (6.4) ;

Arrondir α à un nombre entier.

7.1.2 - Calcul du nombre N de staphylocoques à coagulase positive identifiés présents dans la prise d'essai :

Pour celles des boîtes qui contiennent 300 colonies au maximum, dont 150 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques pour deux dilutions successives, calculer le nombre de staphylocoques à coagulase positive pour chaque boîte tel qu'il est indiqué en (7.1.1) et calculer le nombre N de staphylocoques à coagulase positive identifiés présents dans l'échantillon pour essai, en tant que moyenne pondérée à partir des deux dilutions successives à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\sum \alpha}{V(n_1 + 0{,}1\ n_2)\ d}$$

Où :

$\sum \alpha$: Somme des colonies de staphylocoques à coagulase positive identifiées sur l'ensemble des boîtes retenues ;

V: Volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres ;

n_1 : Nombre de boîtes retenues à la première dilution ;

n_2 : Nombre de boîtes retenues à la seconde dilution ;

d : Taux de dilution correspondant à la première dilution retenue (la suspension mère est une dilution).

Arrondir à deux chiffres significatifs les résultats obtenus.

Noter le résultat comme étant le nombre de staphylocoques à coagulase positive par millilitre (produit liquide) ou par gramme (autre produit), exprimé par un nombre compris entre 1 et 9,9 multiplié par 10^x, où x est la puissance appropriée de 10.

7.1.3 - Exemple : Un dénombrement d'un produit après ensemencement avec 0,1 ml de produit a donné les résultats suivants :

- à la première dilution retenue (10^{-2}) : 65 colonies caractéristiques et 85 colonies caractéristiques (aucune colonie non caractéristique) ;

- à la deuxième dilution retenue (10^{-3}) : 3 colonies caractéristiques et 7 colonies caractéristiques (aucune colonie non caractéristique).

Ont été repiquées :

- parmi les 65 colonies, 5 colonies dont toutes les 5 se sont révélées être à coagulase positive ; d'où a = 65 ;

- parmi les 85 colonies, 5 colonies dont 3 se sont révélées être à coagulase positive ; d'où a = 51;

- parmi les 3 colonies, 3 colonies dont toutes les 3 se sont révélées être à coagulase positive ; d'où a = 3 ;

- parmi les 7 colonies, 5 colonies dont toutes les 5 se sont révélées être à coagulase positive ; d'où a =7.

$$N = \frac{65 + 51 + 3 + 7}{0{,}22 \times 10^{-2}} = 57272$$

Le résultat, après arrondissement, est $5{,}7 \times 10^4$.

7.2 - Estimation de petits nombres :

7.2.1 - Si les deux boîtes, au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (autres produits), contiennent chacune moins de 15 colonies identifiées, exprimer l résultat comme suit.

a) Pour les produits liquides, nombre estimé de staphylocoques à coagulase positive par, millilitre :

$$N\alpha = \frac{\sum\alpha}{V \times 2}$$

Où :

$\sum\alpha$: Somme des colonies de staphylocoques à coagulase positive identifiées (7.1.1) sur les deux boîtes retenues ;

V : Volume étalé sur chaque boîte.

b) : Pour les autres produits, nombre estimé de staphylocoques à coagulase positive par gramme :

$$N_e = \frac{\sum\alpha}{V \times 2 \times d}$$

Où :

$\sum\alpha$: Somme des colonies de staphyloêoques à coagulase positive identifiées (7.1.1) sur les deux boîtes retenues ;

d : Taux de dilution de la suspension mère ;

V : Volume étalé sur chaque boîte.

7.2.2 - Si les deux boîtes, au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (autres produits), ne contiennent aucune colonie de staphylocoques à coagulase positive et si l'ensemencement a été effectué avec 0,1 ml d'échantillon, exprimer le résultat comme suit (cas général d'un inoculum de 0,1 ml) :

— moins de 10 staphylocoques à coagulase positive par millilitre (produits liquides) ;

— moins de 10/d staphylocoques à coagulase positive par gramme (autres produits), où d est le taux de dilution de la suspension mère.

Si l'ensemencement a été effectué avec 1 ml d'échantillon, exprimer le résultat comme suit :

— moins de 1 staphylocoque à coagulase positive par millilitre (produits liquides) ;

— moins de $1/d$ staphylocoque à coagulase positive par gramme (autres produits).

8 - Fidélité :

8.1- Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants (transformés en $\log_{10}$) (nombre de staphylocoques à coagulase positive par gramme ou par millilitre) où le rapport, sur une échelle normale, entre le plus élevé et le plus bas des deux résultats d'essai obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans le même laboratoire , par le même opérateur utilisant le même appareillage dans un intervalle de temps le plus court possible, n'excédera que dans 5% des cas au plus la limite de répétabilité.

8.2- Reproductibilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels (transformés en $\log_{10}$) (nombre de staphylocoques à coagulase positive par gramme ou par millilitre), où le rapport, sur une échelle normale, entre le plus élevé et le plus bas des deux résultats d'essai obtenus à l'aide de la même méthode, sur un matériau identique soumis à l'essai dans des laboratoires différents, par des opérateurs différents utilisant des appareillages différents, n'excédera que dans 5% des cas au plus la limite de reproductibilité.

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode utilisant le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive.

Art. 2. — Pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 4 Chaoual 1435 correspondant au 31 juillet 2014.

Amara BENYOUNES.

— — — — — — — —

ANNEXE

Méthode utilisant le mileu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive

La présente méthode spécifie une technique pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (staphylococcus aureus et autres espèces) dans les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale, par comptage des colonies obtenues en milieu solide (milieu au plasma de lapin et au fibrinogène) après incubation en aérobiose à 35° C ou 37° C.

1. TERMES ET DEFINITIONS

Pour les besoins de la présente méthode, les termes et définitions suivants s'appliquent.

1.1 Staphylocoques à coagulase positive

Bactéries formant des colonies caractéristiques en milieu sélectif gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène, lorsque l'essai est effectué selon la technique spécifiée dans la présente méthode.

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 4 Chaoual 1435 correspondant au 31 juillet 2014 rendant obligatoire la méthode utilisant le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 14-154 du 5 Rajab 1435 correspondant au 5 mai 2014 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

1.2 Dénombrement des staphylocoques à coagulase positive

Détermination du nombre de staphylocoques à coagulase positive trouvé par millilitre ou par gramme d'échantillon, lorsque l'essai est effectué selon la technique spécifiée dans la présente méthode.

2. PRINCIPE

2.1 Ensemencement en profondeur du milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène, coulé dans deux boîtes de Petri, avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit est liquide ou avec une quantité déterminée de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Dans les mêmes conditions, ensemencement des dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère, à raison de deux boîtes par dilution.

2.2 Incubation de ces boîtes à 35° C ou 37° C pendant 18 h à 24 h et, si nécessaire, 24 h supplémentaires.

2.3 A partir du nombre de colonies caractéristiques par boîte de Petri, calcul du nombre de staphylocoques à coagulase positive par millilitre ou par gramme d'échantillon pour essai.

3. DILUANT ET MILIEUX DE CULTURE

3.1 Diluant

Se conformer aux règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.

3.2 Milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène.

NOTE- Des milieux commercialisés conformes aux spécifications de la présente méthode peuvent être utilisés. Cependant, en raison de la variabilité constatée des lots de fabrication du supplément, il est recommandé de tester, avant utilisation, chaque lot de solution de fibrinogène bovin et de plasma de lapin en effectuant des contrôles positifs et négatifs.

3.2.1 Milieu de base

Voir la méthode de dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (staphylococcus aureus et autres espèces) technique utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker, à l'exception de la répartition du milieu de base, à raison de 90 ml par flacon.

3.2.2 Solutions

3.2. 2.1 Solution de tellurite de potassium

Préparer la solution de tellurite de potassium comme indiqué dans la méthode de dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (staphylococcus aureus et autres espèces), technique utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker.

3.2.2.2 Solution de fibrinogène bovin

3.2.2.2.1 Composition

Fibrinogène bovin..... 5g à 7g (Selon la pureté du fibrinogène bovin).

Eau stérile..... l 00 ml

3.2.2.2.2 Préparation

En opérant aseptiquement, dissoudre le fibrinogène bovin dans l'eau, juste avant l'utilisation.

3.2.2.3 Solution de plasma de lapin et d'inhibiteur de trypsine

3.2.2.3.1 Composition

Plasma de lapin avec EDTA pour coagulase (plasma coagulase EDTA)..... 30 ml

Inhibiteur de trypsine..... 30 mg

3.2.2.3.2 Préparation

En opérant aseptiquement, dissoudre les composants dans l'eau, juste avant l'utilisation.

3.2.3 Milieu complet

3.2.3.1 Composition

Milieu de base (3.2.1)..... 90 ml

Solution de tellurite de potassium (3.2. 2.1)..... 0,25 ml

Solution de fibrinogène bovin (3.2.2.2)..... 7,5 ml

Solution de plasma de lapin et d'inhibiteur de trypsine (3.2.2.3)..... 2,5 ml

3.2.3.2 Préparation

Faire fondre le milieu de base, puis le laisser refroidir à 48° C ± 1° C dans un bain d'eau (4.3).

Ajouter de façon aseptique les trois solutions, préalablement réchauffées à 48° C ± 1° C dans un bain d'eau et, après chaque addition, mélanger soigneusement par rotation, afin de minimiser la formation de mousse.

Utiliser le milieu complet immédiatement après sa préparation, afin d'éviter une précipitation du plasma.

NOTE- En cas d'utilisation d'une solution commercialisée de fibrinogène bovin et de plasma de lapin, respecter scrupuleusement les instructions du fabricant pour la préparation de cette solution et du milieu complet (notamment la température du milieu de base). Sinon, le milieu peut perdre complètement son activité.

3.3 Préparation des boîtes de milieu gélosé

Voir la méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (staphylococcus aureus et autres espèces), technique utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker.

4. APPAREILLAGE ET VERRERIE

NOTE- Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, à condition que ses spécifications soient convenables.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et, en particulier, ce qui suit :

4.1 Appareil pour la stérilisation en chaleur sèche (four) et en chaleur humide (autoclave) ;

4.2 Etuve, permettant de maintenir les milieux inoculés, les boîtes et les flacons à l'intérieur d'une plage de températures de 35° C ± 1° C ou 37° C ± 1° C.

4.3 Bain d'eau, ou dispositif similaire, réglable à 48° C ± 1° C.

4.4 Boîtes de Petri, stériles, en verre ou en matière plastique.

4.5 Pipettes graduées à écoulement total, de 1 ml, 2 ml et 10 ml de capacité nominale, graduées respectivement en 0,1 ml, 0,1 ml et 0,5 ml.

5. ECHANTILLONNAGE

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

6. PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.

7. MODE OPERATOIRE

7.1 Prise d'essai, suspension mère et dilution

Voir la méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique .

7.2 Ensemencement et incubation

7.2.1 Prendre deux boîtes de Petri stériles (4.4). A l'aide d'une pipette stérile (4.5), transférer dans chacune des boîtes 1 ml de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Prendre deux autres boîtes de Petri stériles, transférer dans chacune des boîtes 1 ml de la première dilution décimale.

Répéter ces opérations avec des dilutions successives, à l'aide d'une nouvelle pipette stérile pour chaque dilution décimale.

7.2.2 Couler, dans chacune des deux boîtes de Petri (7.2.1), le milieu complet (3.2.3) utilisé extemporanément (ne pas le maintenir en surfusion), de façon à obtenir une épaisseur d'environ 3 mm.

Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu de culture et laisser solidifier en posant les boîtes de Petri sur une surface fraîche et horizontale.

7.2.3 Après solidification complète, retourner les boîtes ainsi préparées et les faire incuber à l'étuve (4.2) réglée à 35° C ou 37° C pendant 18 h à 24 h et, si nécessaire, réincuber pendant 18 h à 24 h supplémentaires.

7.3 Comptage des colonies

Après une période d'incubation (7.2.3), les staphylocoques forment de petites colonies noires ou grises ou même blanches, entourées d'un halo de précipitation indiquant une activité de coagulase. Des colonies de *proteus* peuvent présenter en début d'incubation un aspect similaire à celui des colonies de staphylocoques à coagulase positive. Cependant, après 24 h ou 48 h d'incubation, elles prennent un aspect de culture en nappe plus ou moins brunâtre et envahissante qui permet de ne pas les confondre avec les staphylocoques.

Procéder au comptage des colonies caractéristiques pour chaque boîte.

NOTE- Comme la gélose au plasma de lapin et au fibrinogène est fondée sur une réaction de coagulase, il n'est pas nécessaire de confirmer cette activité.

8. EXPRESSION DES RESULTATS

8.1 Cas général

Retenir celles des boîtes qui contiennent 300 colonies au maximum, dont 100 colonies caractéristiques au niveau de deux dilutions successives. Il faut qu'une boîte renferme, au moins, 15 colonies caractéristiques.

Calculer le nombre N de staphylocoques à coagulase positive présents par millilitre ou par gramme de produit en tant que moyenne pondérée à partir de deux dilutions successives à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0{,}1\ n_2)\ d}$$

Où :

$\sum c$: Somme des colonies de staphylocoques caractéristiques sur l'ensemble des boîtes retenues ;

V : Volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres ;

n_1 : Nombre de boîtes retenues à la première dilution ;

n_2 : Nombre de boîtes retenues à la seconde dilution ;

d : Taux de dilution correspondant à la première dilution retenue (la suspension mère est une dilution).

Arrondir à deux chiffres significatifs les résultats obtenus.

Noter le résultat comme étant le nombre de staphylocoques à coagulase positive par millilitre (produit liquide) ou par gramme (autre produit), exprimé par un nombre compris entre 1 et 9,9 multiplié par 10^x, où x est la puissance appropriée de 10.

EXEMPLE

Un dénombrement d'un produit après ensemencement avec 0,1 ml de produit a donné les résultats suivants :

— à la première dilution retenue (10^{-2}) : 66 colonies caractéristiques et 54 colonies caractéristiques ;

— à la deuxième dilution retenue (10^{-3}) : 4 colonies caractéristiques et 7 colonies caractéristiques ;

$$N = \frac{66 + 54 + 4 + 7}{2{,}2 \times 10^{-2}} = 5955$$

Le résultat, après arrondissement, est 6×10^{-3}.

8.2 Estimation de petits nombres

8.2.1 Si les deux boîtes, au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (autres produits), contiennent chacune moins de 15 colonies, exprimer le résultat comme suit :

a) pour les produits liquides, nombre estimé de staphylocoques à coagulase positive par millilitre :

$$N_e = \frac{C}{2}$$

Où :

C : Somme des colonies de staphylocoques à coagulase positive comptées (7.3) sur les deux boîtes retenues ;

b) pour les autres produits, nombre estimé de staphylocoques à coagulase positive par gramme :

$$N_e = \frac{C}{2 \times d}$$

Où :

C : Somme des colonies de staphylocoques à coagulase positive comptées (7.3) sur les deux boîtes retenues ;

d : Taux de dilution de la suspension mère.

8.2.2 Si les deux boîtes, au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (autres produits), ne contiennent aucune colonie de staphylocoques à coagulase positive, exprimer le résultat comme suit :

— moins de 1 staphylocoque à coagulase positive par millilitre (produits liquides) ;

— moins de 1/d staphylocoque à coagulase positive par gramme (autres produits), où d est le taux de dilution de la suspension mère.

9. FIDELITE

9.1 Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants (nombre de staphylocoques à coagulase positive par gramme ou par millilitre, transformés en $\log_{10}$) ou le rapport, sur une échelle normale, entre le plus élevé et le plus bas des deux résultats d'essai obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même appareillage dans un intervalle de temps le plus court possible, n'excédera que dans 5% des cas au plus la limite de répétabilité.

9.2 Reproductibilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels (nombre de staphylocoques à coagulase positive par gramme ou par millilitre, transformés en $\log_{10}$) ou le rapport, sur une échelle normale, entre le plus élevé et le plus bas des deux résultats d'essai obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans des laboratoires différents par des opérateurs différents utilisant des appareillages différents, n'excédera que dans 5% des cas au plus la limite de reproductibilité.

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 14 Chaâbane 1436 correspondant au 2 juin 2015 rendant obligatoire la méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies dans les produits, dont l'activité d'eau est supérieure à 0,95.

— — — —

Le ministre du commerce ;

Vu le décret présidentiel n° 15-125 du 25 Rajab 1436 correspondant au 14 mai 2015 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou El Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu le décret exécutif n° 13-328 du 20 Dhou El Kaada 1434 correspondant au 26 septembre 2013 fixant les conditions et les modalités d'agrément des laboratoires au titre de la protection du consommateur et de la répression des fraudes ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications micro biologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies dans les produits, dont l'activité d'eau est supérieure à 0,95.

Art. 2. — Pour le dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies dans les produits, dont l'activité d'eau est supérieure à 0,95, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet, doivent employer la méthode jointe en annexe.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal Officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 14 Chaâbane 1436 correspondant au 2 juin 2015.

Amara BENYOUNES.

ANNEXE

Méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies dans les produits, dont l'activité d'eau est supérieure à 0,95.

1- Domaine d'application

La présente méthode spécifie une technique horizontale pour le dénombrement des levures et des moisissures viables présentes dans les produits destinés à la consommation humaine ou animale, dont l'activité d'eau est supérieure à 0,95 [œufs, viande, produits laitiers (excepté le lait en poudre), fruits, légumes, pâtes fraîches, etc] au moyen de la technique par comptage des colonies à 25° C ± 1° C.

Cette méthode ne permet pas le dénombrement des spores de moisissures et ne s'applique pas à l'identification de la flore fongique ou à l'examen des aliments pour la recherche des mycotoxines.

La présente méthode n'est pas appropriée pour le dénombrement de champignons résistants à la chaleur, tels que les *Byssochlamys fulva* ou *Byssochlamys nivea* présents dans les fruits et légumes en conserve ou en bouteille.

2. Termes et définitions

Pour les besoins de la présente méthode, les termes et définitions suivantes s'appliquent :

2.1 Levure :

Micro-organisme aérobie, mésophile qui, à 25° C et en utilisant un milieu gélosé dans les conditions décrites dans la présente méthode, se développe à la surface du milieu en formant des colonies (2.4) présentant le plus souvent un contour régulier et une surface plus au moins convexe.

Des levures se développant en profondeur, plutôt qu'à la surface d'un milieu, peuvent former des colonies rondes et lenticulaires.

2.2 Moisissure :

Micro-organisme aérobie, mésophile filamenteux qui, à la surface d'un milieu gélosé et dans les conditions décrites dans la présente méthode, développe habituellement des **propagules** ou des **germes** (2.3) plats ou duveteux ou des **colonies** (2.4) présentant souvent des fructifications colorées et des formes de sporulation.

Des moisissures se développant en profondeur, plutôt qu'à la surface d'un milieu, peuvent former des colonies rondes et lenticulaires.

Note : Il existe des formes intermédiaires des micro-organismes. La distinction entre une **levure** (2.1) et une **moisissure** (2.2) peut être arbitraire.

2.3 Propagule ou germe :

Entité viable, capable de se développer dans un milieu nutritif.

Exemple : Cellule végétative, groupe de cellules, spore, groupe de spores ou morceau de mycélium fongique.

2.4 Colonie :

Accumulation visible localisée de masse microbienne développée sur ou dans un milieu nutritif solide à partir d'une cellule viable.

3. Principe

3.1 Des boîtes de Petri préparées en utilisant un milieu de culture sélectif défini sont ensemencées.

En fonction du nombre de colonies attendu, une quantité spécifique de l'échantillon pour essai (si le produit est liquide) ou de la suspension mère (dans le cas d'autres produits) ou des dilutions décimales de l'échantillon ou de la suspension mère est utilisée.

Des boîtes supplémentaires peuvent être ensemencées dans les mêmes conditions ; en utilisant des dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

3.2 Les boîtes sont ensuite incubées en aérobiose à 25° C ± 1° C pendant cinq (5) jours. Puis, si nécessaire, les boîtes de gélose sont laissées au repos à la lumière du jour pendant un (1) à deux (2) jours.

3.3 Les colonies ou propagules sont alors comptées et, si nécessaire (pour distinguer les colonies de levures et des bactéries). L'identité des colonies douteuses est confirmée par examen à la loupe binoculaire ou au microscope.

3.4 Le nombre de levures et de moisissures par gramme ou par millilitre d'échantillon est calculé à partir du nombre de colonies ou propagules ou germes obtenus sur les boîtes choisies à des taux de dilution permettant d'obtenir des colonies pouvant être dénombrées. Les moisissures et les levures sont comptées séparément, si nécessaire.

4. Diluant et milieu de culture

4.1 Diluant

4.1.1 Généralités

Il est possible d'ajouter des agents tensioactifs, tels que le poly (oxyéthylène) sorbitan monooléate [par exemple Tween 80*] (0,05 %, concentration en masse) pour réduire l'agglutination des spores de moisissures et des conidies.

Sauf dans le cas d'une préparation spécifique de l'échantillon pour essai, il est recommandé d'utiliser de l'eau peptonée à 0,1 % (concentration en masse) comme diluant.

4.1.2 Composition de l'eau peptonée à 0,1% (concentration en masse)

Digestat enzymatique de tissus animaux et végétaux	1g
Eau	1000 ml

4.1.3 Préparation de l'eau peptonée à 0,1 % (concentration en masse)

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH (5.4) à 7 ± 0,2 à 25° C après stérilisation.

4.2 Milieu de culture

4.2.1 Dichloran rose bengalechloramphenicol agar (DRBC)

4.2.1.1 Composition

Digestat enzymatique de tissus animaux et végétaux	5 g
D-Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	10 g
Phosphate monopotassique (KH_2PO_4)	1 g
Sulfate de magnésium ($MgSO_4$, H_2O)	0,5 g
Dichloran (2,6-dichloro-4-nitroaniline)	0,002 g
Rose ben gale	0,025 g
Gélose	12 g à 15 g [a]
Chloramphénicol	0,1 g
Eau, distillée ou déionisée	1000 ml
[a] : En fonction du pouvoir gélifiant de la gélose.	

*Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

4.2.1.2 Préparation

4.2.1.2.1 Généralités

Mettre tous les ingrédients, excepté le chloramphénicol, en suspension dans l'eau et porter à ébullition pour dissoudre complètement. Si nécessaire, ajuster le pH (5.4) à 5,6 ± 0,2 à 25° C, après stérilisation.

Ajouter 10 ml de solution à 1 % (concentration en masse) dans l'éthanol de chloramphénicol et mélanger. Répartir le milieu dans des récipients appropriés (5.5). Stériliser à l'autoclave à 121° C pendant 15 min.

Refroidir immédiatement le milieu dans un bain-marie (5.3) maintenu à une température comprise entre 44° C et 47° C. Répartir ce milieu par portions de 15 ml dans des boîtes de Petri stériles (5.6).

— laisser le milieu se solidifier et sécher

— utiliser immédiatement ou conserver dans l'obscurité jusqu'à son utilisation.

Note - Eviter l'exposition du milieu à la lumière, car les produits de décomposition cytotoxiques peuvent causer la sous-évaluation de la mycoflore dans les échantillons.

4.2.1.2.2 Addition facultative de chlorhydrate de chlortétracycline

Lorsque la prolifération bactérienne peut poser un problème (par exemple dans les viandes crues), il est recommandé d'utiliser le chloramphénicol (50 mg/l) et la chlortétracycline (50 mg/l).

Dans ce cas, préparer le milieu de base (4.2.1.2), comme décrit ci-dessus, avec seulement 50 mg de chloramphénicol, le répartir par quantité de 100 ml et stériliser.

Préparer également une solution avec 0,1% (concentration en masse) de chlorhydrate de chlortétracycline dans de l'eau (relativement instable en solution, elle doit être préparée extemporanément) et stériliser par filtration. Juste avant l'utilisation, ajouter 5 ml de cette solution de manière stérile à 100 ml du milieu de base et verser dans les boîtes. La gentamicine est déconseillée, car elle peut causer l'inhibition de certaines espèces de levures.

4.2.1.2.3 Addition facultative d'éléments trace

Pour que les moisissures présentent toutes leur morphologie, notamment tous les pigments qu'elles produisent habituellement, elles ont besoin d'éléments trace qui ne sont pas présents dans le **DRBC**.

Pour identifier les moisissures dans ce milieu, ajouter la solution d'éléments trace suivante à 1 ml par litre de milieu, avant passage à l'autoclave :

— $ZnSO_4$, $7H_2O$: 1g ;

— $CuSO_4$, $5H_2O$: 0,5g ;

— 100 ml d'eau, distillée ou déionisée.

4.2.1.2.4 Addition facultative de Tergitol *

Afin d'éviter la prolifération de *Mucoraceae* dans les boîtes de gélose, il est recommandé d'ajouter du Tergitol (1 ml/l) au milieu de culture.

4.2.1.3 Essai de performance pour l'assurance de la qualité du milieu de culture

4.2.1.3.1 Généralité

Le milieu DRBC est un milieu solide. La productivité et la sélectivité doivent être soumises à essai selon les spécifications suivantes :

4.2.1.3.2 Productivité

— incubation : Cinq (5) jours à 25° C ± 1° C.

— souches :

Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 ;

Candida albicans ATCC 10231 ;

Aspergillus niger ATCC 16404 ;

Mucor racemosus ATCC 42647.

Ou souches enregistrées comme équivalentes dans d'autres collections fongiques.

* Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

— milieux de référence : Milieux de culture « Sabouraud Dextrose Agar » (SDA).

— méthode de contrôle : Quantitative.

— critères : Rapport de productivité, $P_R \geq 0,5$

— réaction caractéristique : Colonies ou propagules ou germes caractéristiques selon chaque espèce.

4.2.1.3.3 Sélectivité

— incubation : Cinq (5) jours à 25° C ± 1° C.

— souches :

Escherichia coli ATCC 25922 ;

Ou *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ;

Ou souches enregistrées comme équivalentes dans d'autres collections de bactéries.

— méthode de contrôle : Qualitative.

— critères : Inhibition totale.

5. Appareillage et verrerie

L'utilisation de matériel à usage unique est une alternative acceptable à l'utilisation de verrerie réutilisable, à condition qu'il répond aux exigences spécifiées.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et, en particulier, ce qui suit :

5.1 Etuve, pouvant fonctionner à 25° C ± 1° C.

5.2 Pipettes à écoulement total, stériles, d'une capacité nominale de 1 ml et graduées à 0,1 ml.

5.3 Bain-marie, ou appareillage similaire, pouvant fonctionner de 44° C à 47° C.

5.4 pH-mètre, précis à ± 0,1 unité de pH à 25° C.

5.5 Flacons, fioles et tubes, pour bouillir et conserver les milieux de culture et pour effectuer des dilutions.

5.6 Boîtes de petri, stériles, en verre ou en plastique, de 90 mm à 100 mm de diamètre.

5.7 Microscope, pour distinguer les levures des cellules bactériennes (fond clair, grossissement de x 250 à x 1000).

5.8 Etaleurs, en verre ou en plastique (de diamètre inférieur à 2 mm et de longueur 80 mm). Il convient que le diamètre des étaleurs ne dépasse pas 2 mm afin de minimiser la quantité d'échantillon y adhérant à la fin de l'étalement.

5.9 Loupe binoculaire, (grossissement x 6,5 à x 50) pour distinguer et différencier les colonies ou les cellules des levures et moisissures.

6. Echantillonnage

Il convient que l'échantillon envoyé au laboratoire soit réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage. L'échantillon pour le laboratoire ne doit pas être congelé.

L'échantillonnage et la préparation de l'échantillon pour essai se font dans des conditions appropriées.

7. Mode Opératoire

7.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Préparer la prise d'essai, la suspension mère (première dilution) et les dilutions suivantes selon des exigences réglementaires et normatives spécifiques et appropriées au produit concerné. Sauf dans le cas d'une préparation spécifique de l'échantillon pour essai, il est recommandé d'utiliser de l'eau peptonée à 0,1 % (concentration en masse) (4.1.3) comme diluant.

Utiliser un homogénéisateur péristaltique de préférence à un mélangeur ou à un agitateur.

En raison de la sédimentation rapide des spores dans la pipette, maintenir la pipette (5.2) horizontale (et non verticale) lorsqu'elle est remplie du volume approprié de suspension mère et de dilutions.

Agiter la suspension mère et les dilutions afin d'éviter la sédimentation de particules contenant des micro-organismes.

7.2 Ensemencement et incubation

7.2.1 Dans une boîte de gélose de **DRBC** (4.2.1), transférer avec une pipette (5.2) stérile, 0,1 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide ou 0,1 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Dans une deuxième boîte de gélose **DRBC** (4.2.1), transférer à l'aide d'une nouvelle pipette stérile 0,1 ml de la première dilution décimale (10^{-1}) (produit liquide), ou 0,1 ml de la dilution (10^{-2}) (autres produits).

Pour faciliter le dénombrement de faibles populations de levures et de moisissures, des volumes, jusqu'à 0,3 ml d'une dilution (10^{-1}) de l'échantillon ou de l'échantillon pour essai, s'il est liquide, peuvent être répartis dans trois (3) boîtes.

Procéder de la même façon avec les dilutions suivantes en utilisant une nouvelle pipette (5.2) stérile à chaque dilution décimale.

Note : Si la présence de moisissures se développant rapidement est suspectée, se référer à la méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies dans les produits à activité d'eau inférieure ou égale à 0.95.

7.2.2 Etaler l'inoculum sur la surface de la boîte de gélose avec un étaleur (5.8) stérile jusqu'à ce que le liquide soit entièrement absorbé par le milieu.

L'ensemencement des boîtes par inclusion peut également être utilisé, mais dans ce cas, l'équivalence des résultats doit être validée par rapport à l'ensemencement en surface, et la distinction et la différenciation des moisissures et des levures ne sont pas possibles.

La méthode d'étalement en surface peut donner des dénombrements supérieurs. La technique de l'inoculation en surface facilite l'exposition maximale des cellules à l'oxygène atmosphérique et évite l'inactivation thermique des propagules fongiques.

Les résultats dépendent du type de champignons.

7.2.3 Incuber en aérobiose les boîtes préparées (7.2.2), couvercles en haut, en position droite dans l'étuve (5.1) à 25° C ± 1° C pendant cinq (5) jours. Si nécessaire, laisser reposer les boîtes de gélose à la lumière du jour pendant un (1) à deux (2) jours.

Il est recommandé d'incuber les boîtes (5.6) dans un sac plastique ouvert afin d'éviter la contamination de l'étuve en cas de dissémination des moisissures à l'extérieur des boîtes.

7.3 Comptage et sélection des colonies pour confirmation

Lire les boîtes entre deux (2) jours et cinq (5) jours d'incubation. Sélectionner les boîtes (7.2.3) contenant moins de 150 colonies ou propagules ou germes et compter ces colonies ou propagules ou germes.

Si l'on observe un envahissement rapide des boîtes, retenir les comptages obtenus après deux (2) jours, puis de nouveau après cinq (5) jours d'incubation.

Note 1 : Les méthodes de dénombrement des levures et en particulier des moisissures sont imprécises du fait qu'elles consistent en un mélange de mycélium, de spores asexués et sexués. Le nombre d'unité à l'origine de la formation de colonies dépend du degré de fragmentation du mycélium et de la proportion de spores capables de se développer sur le milieu.

Note 2 : Des comptages non linéaires à partir des dilutions décimales se produisent souvent, c'est-à-dire qu'une dilution d'un facteur 10 de l'échantillon n'aboutit généralement pas à une réduction d'un facteur 10 du nombre de colonies à la surface de la boîte de Pétri. Cela est dû à la fragmentation du mycélium et à la dispersion des spores pendant la dilution et à la compétition entre espèces lorsqu'un grand nombre de colonies sont présentes dans la boîte de petri.

Remarque - Les spores des moisissures se disséminent facilement dans l'air, à ce titre, manipuler les boîtes de petri avec précaution pour éviter leur prolifération qui pourrait engendrer une surestimation de la population dans l'échantillon.

Si nécessaire, effectuer un examen à l'aide de la loupe binoculaire (5.9) ou du microscope (5.7) afin de différencier les cellules de levures ou de moisissures des colonies de bactéries.

Les colonies de levures et les colonies propagules de moisissures sont comptées séparément, si nécessaire.

Pour l'identification des levures et des moisissures, sélectionner des zones de développement fongique et effectuer un prélèvement pour un examen microscopique approfondi ou un ensemencement dans des milieux d'isolation ou d'identification appropriés.

8. Expression des résultats et limites de confiance

Les résultats et les limites de confiance doivent être exprimés selon les exigences générales et les recommandations relatives à la microbiologie des aliments.

Compter les colonies de levures et les colonies ou propagules de moisissures séparément, si nécessaire.

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 19 Chaoual 1436 correspondant au 4 août 2015 rendant obligatoire la méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies dans les produits dont l'activité d'eau est inférieure ou égale à 0,95.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 15-125 du 25 Rajab 1436 correspondant au 14 mai 2015, modifié, portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu le décret exécutif n° 13-328 du 20 Dhou EL Kaada 1434 correspqndant au 26 septembre 2013 fixant les conditions et les modalités d'agrément des laboratoires au titre de la protection du consommateur et de la répression des fraudes ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article ler. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies dans les produits, dont l'activité d'eau est inférieure ou égale à 0,95.

Art. 2. — Pour le dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies dans les produits, dont l'activité d'eau est inférieure ou égale à 0,95, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 19 Chaoual 1436 correspondant au 4 août 2015.

Bakhti BELAIB.

ANNEXE

METHODE HORIZONTALE POUR LE DENOMBREMENT DES LEVURES ET MOISISSURES PAR COMPTAGE DES COLONIES DANS LES PRODUITS, DONT L'ACTIVITE D'EAU EST INFERIEURE OU EGALE A 0.95

1. DOMAINE D'APPLICATION

La présente méthode spécifie une technique horizontale de dénombrement des levures osmophiles et des moisissures xérophiles dans les produits destinés à la consommation humaine ou animale, dont l'activité d'eau est inférieure ou égale à 0,95 au moyen de la technique par comptage des colonies à 25 °C ± 1°C [fruits secs, gâteaux, confitures, viande séchée, poisson salé, grains, céréales et produits à base de céréales, farines, noix, épices et condiments, etc].

La présente méthode ne s'applique pas aux produits déshydratés dont l'activité d'eau est inférieure ou égale à 0,60 (céréales déshydratées, produits oléagineux, épices, légumineuses, graines, poudres pour boissons instantanées, produits anhydres pour animaux domestiques, etc.) et ne permet pas le dénombrement des spores de moisissures. Cette méthode ne s'applique pas également, à l'identification de la flore fongique ou à l'examen des aliments pour la recherche de mycotoxines ; et elle n'est pas appropriée au dénombrement des moisissures halophiles xérophiles (*Polypaecilum pisce et Basipetospora halophila*), qui peuvent notamment se trouver dans le poisson séché.

2. TERMES ET DEFINITIONS

Pour les besoins de la présente méthode, les termes et définitions suivantes s'appliquent :

2.1 Levure : Micro-organisme aérobie, mésophile qui, à 25°C et en utilisant un milieu gélosé dans les conditions décrites dans la présente méthode, se développe à la surface du milieu en formant des colonies (2.4) présentant le plus souvent un contour régulier et une surface plus au moins convexe.

Des levures se développant en profondeur, plutôt qu'à la surface d'un milieu, peuvent former des colonies rondes et lenticulaires.

2.2 Moisissure : Micro-organisme aérobie, mésophile filamenteux qui, à la surface d'un milieu gélosé et dans les conditions décrites dans la présente méthode, développe habituellement des propagules ou des germes (2.3) plats ou duveteux ou des colonies (2.4) présentant souvent des fructifications colorées et des formes de sporulation.

Des moisissures se développant en profondeur, plutôt qu'à la surface, d'un milieu peuvent former des colonies rondes et lenticulaires.

Note : Il existe des formes intermédiaires des micro-organismes. La distinction entre une **levure** (2.1) et une **moisissure** (2.2) peut être arbitraire.

2.3 Propagule ou germe : Entité viable, capable de se développer dans un milieu nutritif.

Exemple : Cellule végétative, groupe de cellules, spore, groupe de spores ou morceau de mycélium fongique.

2.4 Colonie : Accumulation visible localisée de masse microbienne développée sur ou dans un milieu nutritif solide à partir d'une cellule viable.

2.5 levure osmophile et moisissure xérophile :

Champignon capable de se développer avec une activité d'eau inférieure ou égale à 0,95.

3. PRINCIPE

3.1 Des boîtes de Petri préparées en utilisant un milieu de culture sélectif défini sont ensemencées. En fonction du nombre de colonies attendu, une quantité spécifique de l'échantillon pour essai (si le produit est liquide) ou de la suspension mère (dans le cas d'autres produits) ou des dilutions décimales de l'échantillon ou suspension mère est utilisée.

Des boîtes de Petri supplémentaires peuvent être ensemencées dans les mêmes conditions ; en utilisant des dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

3.2 Les boîtes de Petri sont ensuite incubées en aérobiose à 25 °C ± 1°C pendant cinq (5) à sept (7) jours. Puis, si nécessaire, les boîtes de gélose sont laissées au repos à la lumière du jour pendant un (1) à deux (2) jours.

3.3 Les colonies ou propagules sont alors comptées et, si nécessaire (pour distinguer les colonies de levure et de bactérie), l'identité des colonies douteuses est confirmée par examen à la loupe binoculaire ou au microscope.

3.4 Le nombre de levures et de moisissures par gramme ou par millilitre d'échantillon est calculé à partir du nombre de colonies ou propagules ou germes obtenus sur les boîtes de Petri choisies à des taux de dilution permettant d'obtenir des colonies pouvant être dénombrées. Les moisissures et les levures sont comptées séparément, si nécessaire.

4. DILUANT ET MILIEU DE CULTURE

4.1 Diluant

4.1.1 Généralités

L'utilisation d'un diluant comportant une quantité suffisante de soluté [par exemple une solution de 20 % à 35 % (concentration en masse) de glycérol ou de D-glucose] est recommandée pour réduire le choc osmotique des moisissures xérophiles et des levures osmophiles lorsque des dilutions en série sont effectuées avant l'ensemencement.

Note : il est possible d'ajouter des agents tensioactifs, tel que le poly (oxyéthylène) sorbitan monooléate 0,05 % (concentration en masse) pour réduire l'agglutination des spores de moisissures et des conidies.

Sauf dans le cas d'une préparation spécifique de l'échantillon pour essai, il est recommandé d'utiliser de l'eau peptonée à 0,1 % (concentration en masse) comme diluant.

4.1.2 Composition de l'eau peptonée à 0,1 % (concentration en masse)

Digestat enzymatique de tissus animaux et végétaux	1 g
Eau	1000 ml

4.1.3 Préparation de l'eau peptonée à 0,1 % (concentration en masse)

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire. Si nécessaire, ajuster le pH (5.4) à 7 ± 0,2 à 25 °C après stérilisation.

4.2 Milieu de culture

4.2.1 Gélose dichloran à 18% (concentration en masse) de glycérol (DG 18)

4.2.1.1 Composition

Digestat enzymatique de caséine	5 g
D-Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	10 g
Phosphate monopotassique (KH_2PO_4)	1 g
Sulfate de magnésium ($MgSO_4\,H_2O$)	0,5 g
Dichloran (2,6-dichloro-4-nitro-aniline)	0,002 g
Glycérol anhydre	220 g
Gélose	12 g à 15g[a]
Chloramphénicol	0,1 g
Eau distillée ou déionisée	1000 ml
[a] : en fonction du pouvoir gélifiant de la gélose	

4.2.1.2 Préparation

4.2.1.2.1 Généralités

Mettre tous les ingrédients, excepté le chloramphénicol, en suspension dans l'eau et porter à ébullition pour dissoudre complètement. Si nécessaire, ajuster le pH (5.4) à 5,6 ± 0,2 à 25 °C après stérilisation.

Ajouter 10 ml de solution à 1% (concentration en masse) dans l'éthanol de chloramphénicol et mélanger. Répartir le milieu dans des récipients appropriés (5.5). Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 min.

Refroidir immédiatement le milieu dans un bain-marie (5.3) maintenu à une température comprise entre 44 °C et 47 °C. Répartir ce milieu par portions de 15 ml dans des boîtes de Petri stériles (5.6).

Laisser le milieu se solidifier et sécher, si nécessaire, la surface des boîtes de Petri. Utiliser immédiatement ou conserver dans l'obscurité, jusqu'à son utilisation.

Remarque : Eviter l'exposition du milieu à la lumière, car les produits de décomposition cytotoxiques peuvent causer la sous-évaluation de la nycoflore dans les échantillons.

4.2.1.2.2 Addition facultative de chlorhydrate de chlortétracycline

Lorsque la prolifération bactérienne peut poser problème, il est recommandé d'utiliser le chloramphénicol (50 mg/l) et la chlortétracycline (50 mg/l). Dans ce cas, préparer le milieu de base, comme décrit ci-dessus, (4.2.1.2), avec seulement 50 mg de chloramphénicol, le répartir par quantités de 100 ml et stériliser. Préparer également une solution avec 0.1 % (concentration en masse) de chlorhydrate de chlortétracycline dans de l'eau (relativement instable en solution, elle doit être préparée extemporanément) et stériliser par filtration. Juste avant l'utilisation, ajouter 5 ml de cette solution de manière stérile à 100 ml du milieu de base et verser dans les boîtes de Petri. La gentamicine est déconseillée, car elle peut causer l'inhibition de certaines espèces de levures.

4.2.1.2.3 Addition facultative d'éléments trace

Pour que les moisissures présentent toute leur morphologie, notamment tous les pigments qu'elles produisent habituellement, elles ont besoin d'éléments trace qui ne sont pas présents dans le DG 18 (4.2.1).

Pour identifier les moisissures dans ce milieu, ajouter la solution d'éléments trace suivante à 1 ml par litre de milieu, avant passage à l'autoclave :

— $ZnSO_4$, $7H_2O$ 1g ;

— Cu SO_4 ,$5H_2O$ 0,5 g ;

— 100 ml d'eau distillée ou déionisée.

4.2.1.3 Essai de performance pour l'assurance de qualité du milieu de culture

4.2.1.3.1 Généralités

Le milieu DG 18 (4.2.1) est un milieu solide. La productivité et la sélectivité doivent être soumises à essai selon les spécifications suivantes :

4.2.1.3.2 Productivité

Incubation : cinq (5) jours à 25 °C ± 1 °C.

Souches :

— *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

— *Wallemia sebi* ATCC 42694

— *Aspergillus restrictus* ATCC 42693

— *Eurotium rubrum* ATCC 42690

— Ou souches enregistrées comme équivalentes dans d'autres collections fongiques.

Milieux de référence : milieux de culture SDA (Sabouraud Dextrose Agar)

Méthode de contrôle : quantitative

Critères : rapport de productivité, $P_R \geq 0,5$

Réaction caractéristique : colonies ou propagules ou germes caractéristiques selon chaque espèce.

4.2.1.3.3 Sélectivité

Incubation : cinq (5) jours à 25 °C ± 1 °C

Souches :

— *Escherichia coli* ATCC 25922

— *Ou Bacillus subtilis* ATCC 6633

— Ou souches enregistrées comme équivalentes dans d'autres collections de bactéries.

Méthode de contrôle : qualitative

Critères : inhibition totale

5. APPAREILLAGE ET VERRERIE

L'utilisation de matériel à usage unique est une alternative acceptable à l'utilisation de verrerie réutilisable, à condition qu'il répond aux exigences spécifiées.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et, en particulier, ce qui suit :

5.1 Etuve, pouvant fonctionner à 25 °C ± 1°C

5.2 Pipettes à écoulement total, stériles, d'une capacité nominale de 1 ml et graduées en 0,1 ml.

5.3 Bain-marie, ou appareillage similaire, pouvant fonctionner de 44 °C à 47 °C.

5.4 pH-mètre, précis à ± 0,1 unité de pH à 25 °C.

5.5 Bouteilles, **fioles et tubes**, pour bouillir et conserver les milieux de culture et pour effectuer des dilutions.

5.6 Boîtes de Petri, stériles, en verre ou en plastique, de 90 mm à 100 mm de diamètre.

5.7 Microscope, pour distinguer les levures de cellules bactériennes (fond clair, grossissement de x 250 à x 1000).

5.8 Etaleurs, en verre ou en plastique (diamètre inférieur à 2 mm et de longueur 80 mm). Il convient que le diamètre des étaleurs ne dépasse pas 2 mm afin de minimiser la quantité d'échantillon y adhérant à la fin de l'étalement.

5.9 Loupe binoculaire, (grossissement de x 6.5 à x 50) pour distinguer et différencier les colonies ou cellules des levures et moisissures.

6. ECHANTILLONNAGE

Il convient qu'un échantillon représentatif, non endommagé ou altéré au cours du transport ou de l'entreposage, ait été envoyé au laboratoire. L'échantillon pour laboratoire ne doit pas être congelé.

7. MODE OPERATOIRE POUR LA PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI

7.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Préparer la prise d'essai, la suspension mère (première dilution) et les dilutions suivantes selon les exigences réglementaires et normatives spécifiques et appropriées aux produits concernés.

Sauf dans le cas d'une préparation spécifique de l'échantillon pour essai, il est recommandé d'utiliser de l'eau peptonée à 0,1 % (concentration en masse) (4.1.3) comme diluant. Utiliser un homogénéisateur péristaltique de préférence à un mélangeur ou un agitateur.

En raison de la sédimentation rapide des spores dans la pipette, maintenir la pipette (5.2) horizontale lorsqu'elle est remplie du volume approprié de la suspension mère et de dilutions.

Agiter la suspension mère et les dilutions afin d'éviter la sédimentation de particules contenant des micro-organismes.

7.2 Ensemencement et incubation

7.2.1 Dans une boîte de gélose DG 18 (4.2.1), transférer avec une pipette (5.2) stérile, 0,1 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide ou 0,1 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Dans une deuxième boîte de gélose DG 18 (4.2.1), transférer avec une nouvelle pipette stérile 0,1 ml de la première dilution décimale (10^{-1}) (produit liquide) ou 0,1 ml de la dilution (10^{-2}) (autres produits).

Pour faciliter le dénombrement de faibles populations de levures et de moisissures, des volumes, jusqu'à 0.3 ml d'une dilution (10^{-1}) de l'échantillon ou de l'échantillon pour essai, s'il est liquide, peuvent être répartis dans trois (3) boîtes de Petri.

Procéder de la même façon avec les dilutions suivantes en utilisant une nouvelle pipette stérile à chaque dilution décimale.

Pour les aliments solides ou particulaires, tels que les noix ou les grains, l'ensemencement direct est recommandé.

Les échantillons de ces types de produits sont désinfectés en surface dans une solution de 0,35 % (1000 µg/g) d'hypochlorite de sodium pendant 2 min, puis rincés avec de l'eau distillée stérile, séchés sur un papier stérile et placés sur un milieu gélosé.

7.2.2 Étaler le liquide sur la surface de la boîte de gélose avec un étaleur (5.8) stérile jusqu'à ce que le liquide soit entièrement absorbé par les milieux.

L'ensemencement des boîtes par inclusion peut également être utilisée, mais dans ce cas, l'équivalence des résultats doit être validée par rapport à l'ensemencement en surface, et la distinction et la différenciation des moisissures et des levures ne sont pas possibles. La méthode d'étalement en surface peut donner des dénombrements supérieurs. La technique de l'inoculation en surface facilite l'exposition maximale des cellules à l'oxygène atmosphérique et évite l'inactivation thermique des propagules fongiques. Les résultats dépendent du type de champignons.

7.2.3 Incuber en aérobiose les boîtes préparées (7.2.2), couvercles en haut, en position droite dans l'étuve (5.1) à 25 °C ± 1°C pendant cinq (5) à sept (7) jours. Si nécessaire, laisser reposer les boîtes de gélose à la lumière du jour pendant un (1) à deux (2) jours.

Si la présence de *Xeromyces bisporus* est suspectée, incuber les boîtes pendant dix (10) jours.

Il est recommandé d'incuber les boîtes de Petri dans un sac plastique ouvert afin d'éviter la contamination de l'étuve en cas de dissémination des moisissures à l'extérieur des boîtes de Petri .

7.3 Comptage et sélection des colonies pour confirmation

Après la période d'incubation spécifiée, sélectionner les boîtes (7.2.3) contenant moins de 150 colonies ou propagules ou germes et compter ces colonies ou propagules ou germes.

Si on observe un envahissement rapide des boîtes, compter les colonies ou propagules ou germes après deux (2) jours, puis de nouveau après cinq (5) à sept (7) jours d'incubation.

Note 1 : Les méthodes de dénombrement des levures et en particulier des moisissures sont imprécises du fait qu'elles consistent en un mélange de mycélium, de spores asexués et sexués. Le nombre d'unités à l'origine de la formation de colonies dépend du degré de fragmentation du mycélium et de la proportion de spores capables de se développer sur le milieu.

Note 2 : Des comptages non linéaires à partir des dilutions décimales se produisent souvent, c'est-à-dire qu'une dilution d'un facteur 10 de l'échantillon n'aboutit généralement pas à une réduction d'un facteur 10 du nombre de colonies à la surface de la boîte de petri. Cela est dû à la fragmentation du mycélium et à la dispersion des spores pendant la dilution et à la compétition entre espèces lorsqu'un grand nombre de colonies sont présentes dans la boîte de pétri.

Remarque : les spores des moisissures se disséminent dans l'air aisément, à ce titre, manipuler les boîtes de petri avec précaution pour éviter leur prolifération qui pourrait engendrer une surestimation de la population dans l'échantillon.

Si nécessaire, effectuer un examen à l'aide de la loupe binoculaire (5.9) ou du microscope (5.7) afin de différencier les cellules de levures ou de moisissures des colonies de bactéries.

Les colonies de levures et les colonies ou les propagules de moisissures sont comptées séparément, si nécessaire.

Pour l'identification des levures et des moisissures, sélectionner des zones de développement fongique et effectuer un prélèvement pour un examen microscopique approfondi ou un ensemencement dans des milieux d'isolation ou d'identification appropriés.

8. EXPRESSION DES RESULTATS ET LIMITES DE CONFIANCE

Les résultats et les limites de confiance doivent être exprimés selon les exigences générales et les recommandations relatives à la microbiologie des aliments.

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DU COMMERCE

DIRECTION GÉNÉRALE DU CONTRÔLE ÉCONOMIQUE ET DE LA RÉPRESSION DES FRAUDES

Direction des Laboratoires d'Essais et d'Analyses de la Qualité

MÉTHODES OFFICIELLES D'ANALYSES RELATIVES AUX PRODUITS NON ALIMENTAIRES

Sommaire

1. Arrêté du 25 Novembre 2006 relatif à la méthode de détermination de la teneur en chlore actif et en hypochlorite de sodium dans l'eau de javel. (JO n° 13- 2007)	**01**

ARRETES, DECISIONS ET AVIS

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 4 Dhou El Kaada 1427 correspondant au 25 novembre 2006 rendant obligatoire une méthode de détermination de la teneur en chlore actif et en hypochlorite de sodium dans l'eau de Javel.

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu le décret présidentiel n° 06-176 du 27 Rabie Ethani 1427 correspondant au 25 mai 2006 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu l'arrêté interministériel du 16 Dhou El Kaada 1417 correspondant au 24 mars 1997 relatif aux spécifications techniques et aux conditions et modalités de mise à la consommation des eaux et extraits de Javel ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de détermination de la teneur en chlore actif et en l'hypochlorite de sodium dans l'eau de Javel.

Art. 2. — Pour la détermination de la teneur en chlore actif et en l'hypochlorite de sodium dans l'eau de Javel, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 4 Dhou El Kaada 1427 correspondant au 25 novembre 2006.

Lachemi DJAABOUBE.

———————

ANNEXE

METHODE DE DETERMINATION DE LA TENEUR EN CHLORE ACTIF ET EN HYPOCHLORITE DE SODIUM DANS L'EAU DE JAVEL

1. définition

1.1 Chlore actif : est la concentration de l'hypochlorite de sodium en solution. Le chlore actif est la mesure du pouvoir oxydant des solutions d'hypochlorite. Il permet de définir la quantité de chlore chimiquement équivalente à l'oxygène qui produirait le même effet durant la décomposition complète de l'hypochlorite en chlorure de sodium et en oxygène.

Une molécule d'hypochlorite a une teneur en chlore actif de 95,3 %.

1.2 Degré chlorométrique : C'est le nombre de litres de chlore sec, à 0 °C et sous une pression de 1 bar (0,1 mPa) qu'un litre de solution d'hypochlorite de sodium à 20° C est susceptible de dégager en présence d'un acide.

Un litre de chlore gazeux à 0° C et sous pression de 1 bar pèse 3,17 grammes.

2. Principe

Oxydation de l'iodure de potassium en milieu acétique et titrage de l'iode libéré par une solution décinormale de thiosulfate de sodium en présence d'amidon.

3. Réactifs

Les réactifs doivent être de pureté analytique reconnue.

3.1 Acide acétique glacial

3.2 Iodure de potassium (KI) pur en cristaux et exempt d'iodates.

3.3 Thiosulfate de sodium ($Na_2 S_2O_3$) solution 0,1N.

Dissoudre 25 g de thiosulfate de sodium pentahydraté ($Na_2 S_2O_3$, $5H_2 O$) en cristaux frais dans un litre d'eau bouillie puis refroidir.

La solution est plus stable si la verrerie est préalablement nettoyée avec de l'acide sulfochromique et rincée soigneusement avec de l'eau distillée.

Le titrage de la solution de thiosulfate de sodium est effectué à l'aide d'une solution d'iodate de potassium ($KI0_3$) préparée comme suit :

Peser 3,567g d'iodate de potassium, exempt d'humidité, transférer dans une fiole de 1 litre, dissoudre dans de l'eau et mélanger soigneusement : cette solution est exactement 0,1N. Pour titrer la solution de thiosulfate de sodium ($Na_2 S_2O_3$), prendre 50 ml de la solution d'iodate déjà préparée, le verser dans un erlenmeyer 250 ml, diluer 100 ml avec de l'eau distillée et ajouter 1g d'iodure de potassium en cristaux. Après dissolution de KI, additionner 15 ml d'HCI 0,1 N et titrer immédiatement après avec la solution de ($Na_2S_2O_3$).

Dès que la solution vire au jaune, ajouter 1 ml de solution d'amidon (indicateur) et compléter le titrage jusqu'à disparition de la coloration bleue.

Effectuer des titrages de la solution ($Na_2S_2O_3$) au moins une fois par mois.

La normalité de la solution ($Na_2S_2O_3$) est égale à :

$$\frac{50 \ . \ 0,1}{V_T}$$

Où

V_T : est le volume, en millilitres, de la solution ($Na_2S_2O_3$) requis pour titrer la solution de KIO_3

50 : est le volume, en millilitres, de la solution KIO_3

0,1 : est la normalité de la solution KIO_3

3.4 Amidon : Solution indicateur à 0,5%

— Mélanger 0,5 g d'amidon à 5 ml d'eau froide et ajouter 95 ml d'eau bouillie. Mélanger, refroidir et stocker dans un flacon propre.

— La solution d'amidon étant instable, la remplacer souvent ou y ajouter l'équivalent de 0,1 % d'acide salicylique pour minimiser la dégradation.

4. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire.

5. MODE OPERATOIRE

5.1 Préparation de l'échantillon

Selon la concentration initiale de la solution d' hypochlorite de sodium, effectuer des dilutions pour obtenir une teneur en chlore actif voisine de l° chlorométrique, (par exemple au 1/10 pour les solutions d' hypochlorite à 10°- 12°, au 1/20 pour les solutions à 18°- 20° et au 1/50 pour les solutions à 47°- 50°).

5.2 Prise d'essai

Prélever à l'aide d'une pipette 10 ml de la dilution préparée en (5.1).

5.3 Dosage

Dans un erlenmeyer de 250 ml, dissoudre 2 à 3g d'iodure de potassium (3.2) dans 50 ml d'eau. Ajouter 10 ml d'acide acétique (3.1), puis verser la prise d'essai (5.1) dans l'erlenmeyer en maintenant l'extrémité de la pipette sous la surface du liquide.

Titrer l'iode qui se dégage en une seule étape à l'aide de la solution de thiosulfate de sodium (3.3). Quand la solution vire du brun foncé au jaune pâle (couleur paille) ajouter 1 ml de la solution d'amidon (3.4) et continuer à titrer jusqu'à disparition de la couleur bleue. Noter le volume de thiosulfate utilisé.

6. EXPRESSION DES RESULTATS

6.1 Teneur en chlore actif

6.1.1 Chlore actif, en g/l

$$3,546 \cdot N \cdot V \cdot R$$

6.1.2 Chlore actif, en pourcentage massique

$$\frac{3,546 \cdot N \cdot V \cdot R}{1000 \cdot d}$$

6.2 TENEUR EN HYPOCHLORITE

6.2.1 Hypochlorite N_aOCl, en g/l.

$$3,721 \cdot N \cdot V \cdot R$$

6.2.2 Hypochlorite N_aOCI, % massique

$$\frac{3,721 \cdot N \cdot V \cdot R \cdot 100}{1000 \cdot d}$$

Où :

d : est la densité à 15° C de la solution d' hypochlorite de sodium ;

N : est la normalité de la solution de thiosulfate de sodium utilisée ;

V : est le volume, en millilitres, de la solution de thiosulfate de sodium consommé pendant le titrage ;

R : est égal au rapport V_1/V_2 dans lequel V_1 est le volume, en millilitres, du matras jaugé servant à la dilution et V_2 le volume, en millilitres, de la solution d'hypochlorite de sodium ayant servi à la préparation de la dilution ;

Pour les différentes solutions d'hypochlorite de sodium le facteur R a pour valeurs ;

R = 10 pour les solutions à 10° - 12°

R = 20 pour les solutions à 18° - 20°

R = 50 pour les solutions à 47°- 50°